

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg – Essen

Aus dem Institut für Pharmakogenetik

Funktionelle Untersuchungen der G-Proteinuntereinheit G β 3 und einer
Spleissvariante G β 3s

Inaugural- Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg – Essen

Vorgelegt von
Stefanie Benrath
aus Düsseldorf
2007

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. K.-H. Jöckel
1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. W. Siffert
2. Gutachterin: Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. V. Jendrossek

Tag der mündlichen Prüfung: 4. September 2008

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Signaltransduktion und die Rolle von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	6
1.1.1 Signaltransduktion von Zellen	6
1.1.2 Klassifizierung der G-Proteine.....	6
1.1.3 Aufbau und Funktion G-Protein-gekoppelter Rezeptorsysteme	7
1.1.4 Struktur und Funktion der G-Proteine.....	7
1.1.4.1 Die G α -Untereinheit	9
1.1.4.2 Die G β/γ -Untereinheit	9
1.2 Der C825T Polymorphismus und seine Auswirkungen	10
1.3 Das Sf9-Zellsystem.....	13
1.4 Muskarine Acetylcholin-Rezeptoren	14
1.5 Fragestellung	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Chemikalien	17
2.1.3 Antikörper.....	19
2.1.4 Enzyme	20
2.1.5 Primer.....	20
2.1.6 Vektoren.....	20
2.1.7 Materialien für die Zellkultur:	21
2.1.8 KIT.....	21
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Zellkultur.....	21
2.2.2 cDNA-Herstellung.....	22
2.2.2.1. RNA-Extraktion	22
2.2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	22

2.2.3 PCR-Amplifikation der spezifischen Sequenz	23
2.2.4 Gel-Elektrophorese	24
2.2.5 Ligation in pcDNA 3.1	25
2.2.6 Transformation in DH5 α -Zellen und Amplifikation	26
2.2.7 Sequenzierung	26
2.2.8 Restriktion	26
2.2.9 Klonierung in pFastBac	27
2.2.10 Baculovirusherstellung	31
2.2.11 Einzelklonselektionierung	31
2.2.12 Nachamplifikationen	31
2.2.13 Plaque Assay	32
2.2.14 Identitätsnachweis	35
2.2.14.1 Membranpräparation	35
2.2.14.2 Proteinbestimmung	37
2.2.14.3 Western Blot - SDS- Polyacrylamidgel- Elektrophorese	38
2.2.14.4. Elektrotransfer	41
2.2.14.5. Immunogischer Nachweis von Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran	42
2.2.15 Infektion der Sf9-Zellen	43
2.2.16 Calcium-Messung	43
2.2.16.1 Puffer und Lösungen für die Einzelzellfluorimetrie	44
2.2.16.2 Durchführung der Calcium-Messung	45
2.2.17 Statistik und Grafik	46
3. Ergebnisse	47
3.1 Nachweis der Expression rekombinanter Proteine nach Infektion von Sf9- Zellen mit rekombinanten Baculoviren	47
3.2 Funktionelle Untersuchungen von Sf9-Zellen mittels Calcium-Messung zur Etablierung der Messmethode	48
3.2.1 Stimulation von nicht-infizierten Sf9-Zellen durch Clonidinzugabe	48
3.2.2 Vergleich der Grundaktivität der Sf9-Zellen	50
3.2.3 Vergleich der maximalen Kalzium-Aktivität der Sf9-Zellen	52

3.3 Effekt nach Infektion von Sf9-Zellen mit dem Baculovirus für den humanen M1-Acetylcholin-Rezeptor auf die funktionellen Untersuchungen.....	53
3.4 Funktionelle Untersuchungen von infizierten Sf9-Zellen mit den Baculoviren für den humanen M1-Acetylcholin-Rezeptor und für die humanen Gβ3-Proteinuntereinheiten.....	56
4. Diskussion	61
5. Zusammenfassung.....	68
6. Literaturverzeichnis	69
Abkürzungsverzeichnis	75
Lebenslauf	77

1. Einleitung

1.1 *Signaltransduktion und die Rolle von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren*

1.1.1 Signaltransduktion von Zellen

Die Signaltransduktion ermöglicht die Kommunikation und Interaktion der einzelnen Zelle mit ihrer Umgebung. Dazu muss es eine Möglichkeit geben, Signale, die von außen auf die Zelle treffen, weiter ins Zellinnere zu leiten. Eine Vielzahl von Neurotransmittern, Hormonen und Mediatoren vermitteln ihre Information durch ihre Interaktion mit membranständigen Rezeptoren. Es gibt drei verschiedene Hauptgruppen von zellulären Rezeptoren. Zum einen kommen Rezeptoren mit einer singulären transmembranären Struktur vor, die eine Verbindung zwischen der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne und einer zytoplasmatischen Domäne darstellt. Die zytoplasmatische Domäne kann zum Beispiel eine Kinaseaktivität besitzen, zum Beispiel der Insulinrezeptor. Eine zweite Hauptgruppe von Rezeptoren bildet eine Kanalstruktur. Eine Ligandenbindung führt dann zur Öffnung des Kanals, zum Beispiel der nikotinerge Acetylcholinrezeptor. Eine dritte Gruppe von Rezeptoren ist die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Diese Rezeptoren haben gemeinsam, dass sie sieben mal die Zellmembran durchspannen und mit Guanosin-tri-phosphat-bindenden Proteinen, sogenannten G-Proteinen, intrazellulär verbunden sind. G-Proteine sind heterotrimere Proteine, die Guanosintriphosphat im aktivierten Zustand bzw. im inaktiven Zustand Guanosindiphosphat binden. Eine Stimulation dieser G-Protein-gekoppelten Rezeptoren führt zu einer Aktivierung des G-Proteins und damit zu einer Änderung der Aktivität von Effektoren, zum Beispiel Enzymen oder Ionenkanälen.

1.1.2 Klassifizierung der G-Proteine

Man unterscheidet vier Hauptgruppen von G-Proteinen, die sich in ihrem Vorkommen und ihrer Funktion unterscheiden: G_s -, G_i -, G_q - und G_{12} -Proteine. Es gibt stimulierende G-Proteine ($=G_s$), die über eine Aktivierung der Adenylylzyklase wirken. In der Zelle steigt daraufhin die Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Inhibierend wirkende G-Proteine ($=G_i$) hemmen

die Adenylylzyklase. Damit inhibieren sie die Produktion von zyklischem Adenosinmonophosphat. Es gibt auch inhibierend wirkende G-Proteine, die über Ionenkanäle wirken. Eine Aktivierung der Phospholipase C wird durch G_q -Proteine ausgelöst. Die Phospholipase C spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat ($InsP_3$). Diese second messenger bewirken unter anderem eine Kalziumfreisetzung innerhalb der Zelle. Somit steigt die intrazelluläre Kalziumkonzentration an. Die Wirkungsweise von G_{12} - und G_{13} -Proteine sind noch nicht endgültig bekannt. Es wurde festgestellt, dass die Aktivierung von G_{12} zu einer Modulation des Na^+/H^+ -Austauschers führte. Ebenso spricht man dem G_{12} -Protein einen Einfluss auf Signaltransduktionswege zu, die das Zellwachstum beeinflussen.

1.1.3 Aufbau und Funktion G-Protein-gekoppelter Rezeptorsysteme

Das G-Protein-gekoppelte Rezeptorsystem besitzt drei funktionelle Einheiten: den Rezeptor, das G-Protein und den entsprechenden Effektor. Seine Aufgabe besteht in der Umwandlung von extrazellulären Reizen in intrazelluläre Signale.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren haben gemeinsam, dass die Polypeptidkette des Rezeptors die Lipiddoppelschicht der Zellmembran in Form von sieben α -Helices durchspannt, die durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind (Dixon et al., 1986; Hargrave et al. 1980; Dohlman et al., 1987). Deshalb heißen die entsprechenden Rezeptoren auch heptahelikale Rezeptoren. Der Rezeptor besitzt mehrere Bindungsstellen. Zum einen eine extrazelluläre Bindungsstelle für einen Agonisten, zum anderen eine intrazelluläre Bindungsstelle, die den Kontakt zum intrazellulär membrangebundenen G-Protein ermöglicht. Bei Stimulation durch einen Agonisten kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins. Das G-Protein wird dadurch aktiviert. (Nürnberg et al. 1995).

1.1.4 Struktur und Funktion der G-Proteine

Jedes G-Protein besteht jeweils aus 3 Untereinheiten: der α -, der β - und der γ -Untereinheit. Während die α -Untereinheit zunächst GDP bindet und die Verbindung zum Rezeptor herstellt, sind β - und γ -Untereinheit eine funktionelle Einheit, die nur mit der α -Untereinheit verbunden ist. Die β/γ -Untereinheiten

können nicht voneinander dissoziieren, es sei denn es findet eine Denaturierung statt. Bei Stimulation ändert der Rezeptor seine Konformation. Infolge der Konformationsänderung sinkt die Affinität von GDP zu der α -Untereinheit und GDP dissoziiert von der α -Untereinheit ab. Da die Konzentration von GTP in Zellen wesentlich höher als die GDP Konzentration ist, wird nun GTP an die α -Untereinheit gebunden. In diesem aktivierten Zustand dissoziiert die α -Untereinheit vom Rezeptor und von der β/γ -Untereinheit ab. Die α -Untereinheit einerseits und die β/γ -Untereinheit andererseits können nun im Inneren der Zelle über second messenger die Informationen weiterleiten.

Sobald die α -Untereinheit das GTP zu GDP hydrolysiert hat, ist sie inaktiv und kehrt in die Ausgangsposition, gebunden an den Rezeptor und die β/γ -Untereinheit, zurück (Hamm, 1998). In Abbildung 1.1 ist der G-Protein-Zyklus dargestellt.

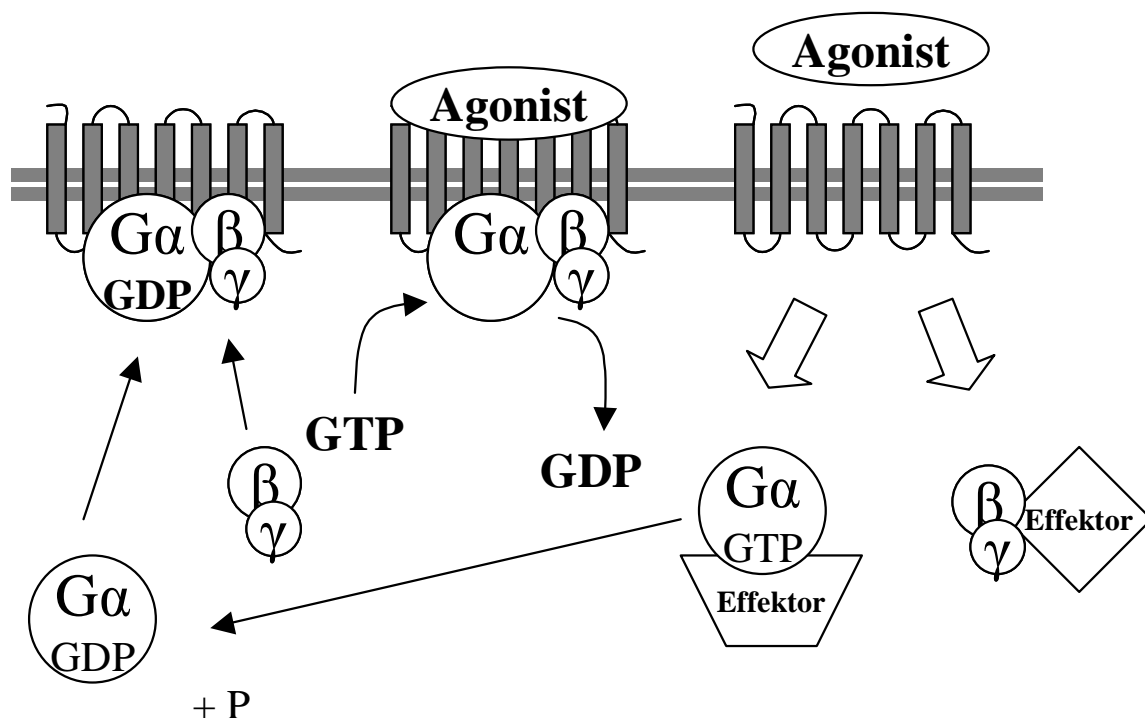


Abbildung 1.1: G-Protein-Zyklus

Die Bindung des Agonisten bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors und führt zum Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit. Die dissoziierten α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten wirken auf verschiedene Effektorsysteme.

Nach Spaltung von GTP zu GDP löst sich die α -Untereinheit von dem Effektor ab und reassoziert mit dem $\beta\gamma$ -Dimer und dem Rezeptor.

Während der Aktivierung des G-Proteins wirken sowohl die α -Untereinheit als auch die β/γ -Untereinheit über verschiedene Signalwege. Mehr als 20 verschiedene α -Untereinheiten sind bekannt, etwa 6 verschiedene β -Untereinheiten und 12 verschiedene γ -Untereinheiten. Sowohl die α -Untereinheit als auch die β/γ -Untereinheiten können über unterschiedliche Mechanismen im Inneren der Zelle wirken. Die α -Untereinheit aktiviert oder hemmt zum Beispiel die Adenylzyklase, die die Konzentration von cAMP bestimmt (Hamm, 1998). Die β/γ -Untereinheit kann die Öffnung von Ionenkanälen, zum Beispiel Kaliumkanälen, bewirken oder über Enzyme wie die Phospholipase A₂ oder die Phosphoinositide-3-kinase wirken, um nur einige Beispiele zu nennen. Außerdem kann die β/γ -Untereinheit die Phospholipase C aktivieren, die das Membranlipid Phosphatidylinositol zu Inositol (1,4,5) trisphosphat und Diacylglycerin spaltet. Inositol (1,4,5) trisphosphat stimuliert das endoplasmatische Retikulum zur Abgabe von Kalzium-Ionen in das Zytosol. Als Resultat steigt die intrazelluläre Kalziumkonzentration.

1.1.4.1 Die G α -Untereinheit

Die G α -Untereinheit besteht aus zwei Domänen. Die eine Domäne ist die G-Domäne, die GTP bindet und hydrolysiert. Strukturell gehört sie zu der Superfamilie der GTPasen. Die andere Domäne ist eine einzige helikale Domäne, die das GTP im Kern des Proteins verdeckt. Bindet die G α -Untereinheit GTP findet eine Konformationsänderung in drei flexiblen Regionen statt und die Affinität zur β/γ -Untereinheit nimmt ab. Entscheidend für die Spezifität der G α -Untereinheit sind die letzten 7 bzw. 5 Aminosäuren der C-terminalen Region. Sie bestimmen die möglichen Interaktionen der Untereinheit. Ein größerer Teil der C-terminalen Region und die N-terminale Region haben Kontakt zum Rezeptor.

1.1.4.2 Die G β/γ -Untereinheit

Die G β -Proteine gehören zu der Superfamilie der Propeller-Proteine und kennzeichnen sich durch die 7fache Sequenzwiederholung aus. Jede Wiederholung besteht aus etwa 40 Aminosäuren und bildet je ein Propellerblatt.

Das heißt, dass die β -Untereinheit aus 7 Propellerblättern besteht. Über das N-Endstück ist die β -Untereinheit mit der γ -Untereinheit verbunden, was sie zu einer funktionellen Einheit macht.

Es sind bisher 5 verschiedene β -Untereinheiten bekannt. Die Untereinheiten β_1 - β_4 sind zu über 80% identisch, während β_5 nur zu ca. 50% identisch zu den anderen β -Untereinheiten ist. Die Unterschiede zwischen β_5 und den anderen β -Untereinheiten erklären sich aus den unterschiedlichen Funktionen und der Breite der Systeme, in denen sie auf Effektoren wirken. Die hohe Sequenzähnlichkeit zwischen β_1 - β_4 lässt vermuten, dass auch ihre Funktionen recht ähnlich sind, obwohl einige Untersuchungen Unterschiede bei der Modulationsmöglichkeiten als Effektor festgestellt haben (Yongmin et al. 2001).

Wichtig zu erwähnen bleibt, dass die $G\beta$ -Untereinheit alleine nicht funktionsfähig ist. Tatsächlich bildet sie zusammen mit der $G\gamma$ -Untereinheit ein funktionelles Monomer, dass nur durch Denaturierung trennbar ist. Die Struktur der $G\gamma$ -Untereinheit scheint α -helikal zu sein. Die Prenylgruppe am C-Terminus von γ befindet sich an der Außenfläche von $\beta\gamma$, denn sie hält die Verbindung zur Zellmembran. Die Selektivität der γ -Untereinheiten für verschiedene β -Untereinheiten wird durch 14 Aminosäuren in der Mitte der γ -Untereinheit festgelegt. Diese Region von 14 Aminosäuren enthält das Cystein, welches den Kontakt zur β -Untereinheit hält. Von den $G\gamma$ -Untereinheiten konnten bisher zwölf verschiedene Subtypen identifiziert werden, die in ihrer Aminosäuresequenz eine größere Vielfalt als die $G\beta$ -Untereinheiten zeigen.

Funktionell hat die β/γ -Untereinheit die Möglichkeit, die $G\alpha$ -Untereinheit zu stabilisieren und deren Affinität für die Rezeptorbindung zu erhöhen. Außerdem besitzt sie die Fähigkeit, allein oder synergistisch mit der $G\alpha$ -Untereinheit verschiedenste Effektoren zu aktivieren oder zu inhibieren, zum Beispiel Ionenkanäle oder Phospholipasen.

1.2 Der C825T Polymorphismus und seine Auswirkungen

Im Gen der $G\beta_3$ -Untereinheit wurde im Jahre 1998 in Exon 10 an Position 825 ein C \rightarrow T Polymorphismus gefunden. Ein Einzelbasenpaarpolymorphismus ist ein Austausch einer einzelnen Base im Gen, der nicht zwingend zu einer Veränderung des Phänotyps führen muss. Das codierende Gen für die $G\beta_3$ -Untereinheit,

GNB3, ist auf dem Chromosom 12p13 lokalisiert und besteht aus 11 Exonen. Der C825T Polymorphismus ist stumm. Es kommt nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz, sondern zu einem alternativen Spleissen des GNB3-Gens, welches mit dem T-Allel assoziiert ist. Das entstehende Proteinprodukt ist durch das Spleissen von 123bp um 41 Aminosäuren kürzer als das Wildtyp-Protein. Als Folge kommt es bei Individuen des Genotyps TC und TT zusätzlich zu der Expression des Gβ3-Wildtyps zur Expression dieser um 41 AS verkürzten Proteinvariante Gβ3s.

Gβ3-Proteine gehören zur Superfamilie der „Propellerproteine“ und bestehen aus 7 WD40-Domänen, von denen jede eines der 7 „Propellerblätter“ formt (Wall et al., 1995; Sondek et al., 1996; Clapham & Neer, 1997).

Die oben beschriebene Deletion dieser Spleiss-Variante hat den Verlust einer solchen WD40-Domäne, entsprechend einem Propellerblatt, zur Folge (Siffert et al., 2000). Die graphische Darstellung der Struktur von Gβ3 und Gβ3s findet sich in Abb. 1.2.

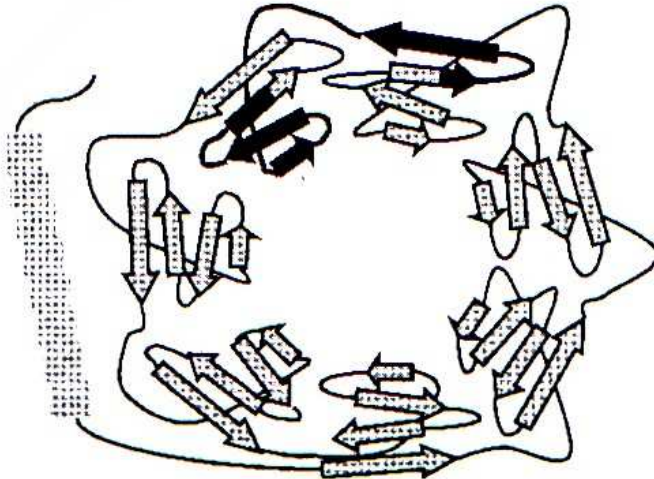


Abb.1.2 Struktur von Gβ3 und Gβ3s

Mögliche Struktur von Gβ3 bestehend aus 7 WD Domänen. Die schwarz markierten Teile sind die Teile, die aufgrund des abweichenden Spleissvorganges in der Struktur von Gβ3s fehlen. (Abb. Überlassen von Prof. Dr. med. D. Roskopf)

Klinische Untersuchungen zeigen eine Assoziation zwischen dem GNB3 825 T-Allel und essentieller Hypertonie sowie mit Faktoren des metabolischen Syndroms wie Dyslipidämie, Hypercholesterinämie und Adipositas auf. (Siffert et al., 1998, 2005; Schunkert et al., 1998). Ebenso weisen Studien ein erhöhtes Risiko für Arteriosklerose und ein erhöhtes Risiko für Schlaganfall und Myokardinfarkt für T-Allel-Träger nach. (Siffert et al., 2005).

Eine gesteigerte Signaltransduktion wurde in Zellen, vor allem Lymphoblasten und Fibroblasten, von T-Allelträgern gefunden (Pietruck et al., 1996, Siffert et al.,

1998). Ebenso konnte eine gesteigerte Plättchenaggregation nach Stimulation bei T-Allel-Trägern nachgewiesen werden (Naber et al., 2000).

Diese Beobachtungen lassen einen zellulären Hintergrund im Sinne einer gesteigerten Signaltransduktion bei T-Allel-Trägern vermuten. Im Zellmodell sollte nun die Auswirkungen von G β 3-Untereinheit und G β 3s-Untereinheit untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde das Sf9-Zellsystem gewählt.

1.3 Das Sf9-Zellsystem

Das Sf9-Zellsystem ist ein Insektenzellsystem, das die Überexpression von Proteinen ermöglicht. Die *Spodoptera frugiperda* Zellen stammen aus den Ovarien des „fall army worm“. Es besteht die Möglichkeit durch spezielle Vektoren genetische Information in die Sf9-Zellen zu schleusen. Diese Vektoren sind rekombinanten Baculoviren wie *Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus* (AcMNPV), die Sf9-Zellen infizieren. Dabei ist die Art der Infektion ein lytischer Zyklus. Das Sf9-System mit Baculovirus vermittelter Expression ist ein gut etabliertes System zur Herstellung von rekombinanten Glykoproteinen geworden. Es erlaubt eine starke Expression von funktionell aktiven Signaltransduktionskomponenten wie Rezeptoren und wurde als Quelle für Proteinreinigung benutzt. Einige der Vorteile des Systems sind die relativ geringen Kosten und die große Biosicherheit.

Die Insektenzellen stellen zunächst eine korrekte Primärstruktur her. Im Bezug auf Proteinfaltung und Posttranslationsprozesse folgen die Insektenzellen den Säugetierzellen. Es ist bewiesen, dass die meisten, wenn nicht sogar alle, Prozesse, die in Säugetierzellen stattfinden auch in Insektenzellen vorhanden sind. So sind die hergestellten Proteine biologisch aktiv und unterscheiden sich nicht von ihren „Originalen“ (Altmann et al., 1999).

Es wurde bewiesen, dass Sf9-Zellen alle vier G-Protein-Unterfamilien von Säugetieren als Pendants besitzen. Es kommen G_s-, G_{i/o}-, G_{q/11}-, und G₁₂-ähnliche Proteine in Sf9-Zellen vor. Dies wurde mit Hilfe von spezifischen Antiseren aufgezeigt. Die Kopplung von humanen Histaminrezeptoren und endogenen G-Proteinen der Sf9-Zellen ist möglich.

Die funktionale Kopplung von überexprimierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren von Säugetieren und den weiteren Signaltransduktionskomponenten wie G-Proteine und Enzymen wurde bestätigt (Leopoldt et al., 1997)

1.4 Muskarine Acetylcholin-Rezeptoren

Die muskarinen Acetylcholin-Rezeptoren vermitteln im Organismus eine Vielzahl von Wirkungen über ihren physiologischen Agonisten Acetylcholin. Sie gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren und bilden eine Familie von siebenmal durch die Zellmembran spannende Proteinen. Diese Proteine antworten auf eine Reihe von sensorischen und chemischen Stimuli, z.B. Licht, Hormone und Neurotransmitter. Muskarine Rezeptoren kommen vor allem in den Plasmamembranen von Neuronen vor und in allen Zellen, die parasymphatisch oder durch das Darmnervensystem innerviert werden, wie Drüsen-, glatte Muskel- und Herzmuskelzellen. Dort übertragen sie extrazelluläre Stimuli in das Zellinnere durch eine Stimulation von heterotrimeren Guaninenukleotidbindenden Proteine.

Die Familie der muskarinen Acetylcholin-Rezeptoren umfasst fünf unterschiedliche Rezeptorsubtypen, die von fünf verschiedenen Genen kodiert und als M1- bis M5-Acetylcholin-Rezeptoren bezeichnet werden. Die Subtypen der M-Acetylcholinrezeptoren sind Glycoproteine und unterscheiden sich in der Länge und Zusammensetzung der Aminosäurenketten, dem Ort ihres Vorkommens und ihrer Funktionsweise. So besitzt der menschliche M1-Acetylcholin-Rezeptor 460 Aminosäuren, der M2-Acetylcholinrezeptor 466 Aminosäuren, der M3-Acetylcholinrezeptor 590 Aminosäuren, der M4-Acetylcholinrezeptor 479 und der M5-Acetylcholinrezeptor 532 Aminosäuren. Es gibt einige Gemeinsamkeiten im Aufbau der Subtypen der muskarinen Rezeptoren. So ist das C-terminale Ende intrazellulär lokalisiert. Zwischen der ersten und dritten extrazellulären Schleife wurden Disulfidbrücken bei M1- und M3-Acetylcholinrezeptoren gefunden.

Über eine kurze Aminosäuresequenz in der dritten intrazellulären Schleife findet die Kopplung an G-Proteine statt. Die Aminosäuresequenz ist subtypenspezifisch für die M-Acetylcholinrezeptoren (Dhein et al. 2001).

Die fünf unterschiedliche M-Acetylcholin-Rezeptoren unterscheiden sich wie bereits erwähnt auch in ihrer Verteilung innerhalb des Organismus. So wurden in unterschiedlichen Säugetiergeweben unterschiedlichen Expressionsmustern der einzelnen Rezeptorsubtypen gefunden. Der M1-Acetylcholin-Rezeptor befindet sich im Cortex und Hippocampus des Gehirns und in den Ganglien des autonomen Nervensystems. Hingegen ist der M2-Acetylcholin-Rezeptor vor allem im Herzmuskel zu finden. Der M3-Acetylcholin-Rezeptor wurde vorwiegend in

glatten Muskelzellen und sekretorischen Drüsen nachgewiesen. Im Cortex, Striatum und Hippocampus des zentralen Nervensystems und in der Hypophyse befindet sich der M4-Acetylcholin-Rezeptor. Der M5-Acetylcholin-Rezeptor wurde in kleinen Mengen in der Substantia nigra und dem Hippocampus gefunden.

Die Subtypen M₁, M₃ und M₅ koppeln bevorzugt an G_{q/11} Proteine, die die Phospholipase C stimulieren und damit Inositol-1,4,5-triphosphat und Diacylglycerol freisetzen, während M₂ und M₄-Acetylcholin-Rezeptoren via Pertussistoxinsensitive G_i-Proteine bevorzugen und so zu einer Hemmung der Adenylylcyclase führen. (Kaiser et al., 2003).

1.5 Fragestellung

Aufgrund der Tatsache, dass T-Allel-Träger des GNB3 C825T-Polymorphismus zusätzlich zum Wildtyp G β 3 die Spleissvariante G β 3s exprimieren, stellt sich die Frage nach deren Eigenschaften und Funktion. Dazu wurden beide Untereinheiten mit Hilfe des Sf9-Zellsystems exprimiert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit dem Virus für den humanen M1-Acetylcholinrezeptor koinfiziert. So ergibt sich die Möglichkeit die infizierten Sf9-Zellen mit Carbachol zu stimulieren, um die Freisetzung von Kalzium innerhalb der Zelle mittels Fluoreszenz zu untersuchen. Mit den Ergebnissen dieser funktionellen Untersuchungen wird man eine Aussage über die möglichen Unterschiede in der Aktivierbarkeit und Funktion der beiden Untereinheiten treffen können.

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist das „in-vitro“-Modell mit Sf9-Zellen und Baculoviren aussagekräftig, um funktionelle Untersuchungen auf zellulärer Ebene an den beiden G β 3-Untereinheiten vornehmen zu können ?
2. Werden die verschiedenen G β -Untereinheiten nach Infektion von Sf9-Zellen mit Baculoviren gleich stark exprimiert ?
3. Sind die Grundaktivität und maximale Reaktion der Sf9-Zellen gleichbleibend vergleichbar ?
4. Gibt es eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Carbachol und der Höhe des Kalziumsignals ?
5. Gibt es Unterschiede zwischen G β 3s und G β 3 in ihrer Stimulierbarkeit und ihrer Stärke der Signaltransduktion messbar in Form der Kalziumkonzentrationsänderung ?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Blot Kammer SE 600	Pharmacia Biotech, San Fransisco, USA
Cellstar Brutschrank	Nunc GmbH, Wiesbaden, Germany
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100	Zeiss, Jena, Germany
Kavitationsanlage Ashcroft	Duralife, South Williamsport, USA
Lamina flow workstation	Microflow, Peseux, Schweiz
Omnifuge 2.0 RS	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
PCR-Maschine Biometra T-Gradient	Biotron, Göttingen, Germany
PCR-Maschine Biometra Uno-Thermoblock	Biotron, Göttingen, Germany
Software zur Fluoreszenzmessung Attofluor Ratio Vision	Atto Instruments, INC. Rockville, USA
Sorvall Zentrifuge	Du Pont Instruments, Bad Homburg
Stromquelle Macrodrive 1	LKB, Bromma, Schweden
Stromquelle Model 200/2.0 Power supply	Bio-rad, Hercules, USA
Thermostatic Circulator Multitemp II	LKB, Bromma, Schweden
Transferkammer TransBlot	Bio-rad, Hercules, USA
Ultrospec II	LKB Biochrom, Cambridge, UK
Wasserbad	Lauda, Dresden
Zell-Zählsystem Casy 1	Schärfe System, Reutlingen, Germany
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode

2.1.2 Chemikalien

Acrylamid	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Adenosine-5'-Triphosphate	Boehringer, Mannheim
Agarose	Bio Whittaker Molecular Applications,

	Rockland, USA
Agefix Fixierer	Agfa, Leverkusen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Benzamidine	Sigma, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin BSA	Roth, Karlsruhe
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranoside (X-Gal)	BTS BioTech, St. Leon-Rot
Bromphenoblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Canamycin	Sigma, Deisenhofen
Carbamylcholine Chloride	Sigma, Deisenhofen
Casyton	Schärfe System, Reutlingen
dATP	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
D-Glucose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Digitonin	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DL-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
dNTP	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA-Na-Salz	Roth, Karlsruhe
EGTA Titriplex VI	Merck, Darmstadt
Ethilium Bromide	Sigma, Deisenhofen
First Strand Puffer	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Fura 2 AM	Mobitec GmbH, Göttingen
Gentamycin	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
Hepes	Roth, Karlsruhe
Isobutanol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Fluka Biochemika, Steinheim

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)	BTS BioTech, St. Leon-Rot
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Methanol	J. T. Baker, Deventer, Netherlands
Milchpulver	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Neuton liquid developer	Agfa, Leverkusen
Neutralrot	Sigma, Deisenhofen
oligoDT	Fermentas, St. Leon-Rot
pFU-Puffer	Promega, Madison, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma, Deisenhofen
Poly-L-Lysin	Biochrom AG, Berlin
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
RNAase free Dnase	Stratagene, La Jolla, USA
Saccharose	Merck, Darmstadt
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe
Soybean Trypsin Inhibitor	Sigma, Deisenhofen
Sulfosalicylsäure	Roth, Karlsruhe
Tango Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Tetra Ethyl Ethylene diamin	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Tetramycin	Sigma, Deisenhofen
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Triethanolaminhydrochlorid	Merck, Darmstadt
Trishydroxymethylaminomethane (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton x-100	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Fluka Chemie, Buchs
Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA
Whatman Chr Papier	Biometra, Göttingen

2.1.3 Antikörper

Gβ (T-20) cat # 378, lot 117	Santa Cruz, CA, USA
------------------------------	---------------------

Anti rabbit IgG, Peroxidase konjugiert	Sigma, Deisenhofen
Tetra His Antikörper	Santa Cruz, CA, USA
Anti mouse IgG, Peroxidase konjugiert	Sigma, Deisenhofen
Gβ (T-20) cat # 378, lot 237	Santa Cruz, CA, USA
rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz, CA, USA
His Probe (H-3)	Santa Cruz, CA, USA

2.1.4 Enzyme

pFU-Taq	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
BAM H1	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
ECO R1	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq PCR Mastermix	Qiagen, Hilden

2.1.5 Primer

His Gβs sense	Gibco life science, Gaithersburg, USA
pcDNA 3.1 antisense	Gibco life science, Gaithersburg, USA
pGEMT T7	Gibco life science, Gaithersburg, USA
pGEMT SP6	Gibco life science, Gaithersburg, USA
Gα 12 sense	Gibco life science, Gaithersburg, USA
Gα 12 antisense	Gibco life science, Gaithersburg, USA
Gαz sense	Gibco life science, Gaithersburg, USA
Gαz antisense	Gibco life science, Gaithersburg, USA
PAR _BAM sense	Gibco life science, Gaithersburg, USA
PAP_ECO sense	Gibco life science, Gaithersburg, USA
rGαi-1 S_BAM	Gibco life science, Gaithersburg, USA
rGαi-1 A_ECO	Gibco life science, Gaithersburg, USA

2.1.6 Vektoren

pcDNA3.1	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
pGEMTeasy	Promega, Madison, USA
pFastBac	Fa. Life Technologies, Eggenstein

2.1.7 Materialien für die Zellkultur:

4% Agarose Gel	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Fetal Bovine Serum	Sigma, Deisenhofen
Grace's Insect Medium	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Lipofectin	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Penicillin-Streptomycin-Solution	Sigma, Deisenhofen
TC-100 Insect Medium	Sigma, Deisenhofen

2.1 8 KIT

Proteinbestimmung BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
PCR-Aufreinigung QIAquick PCR Purification Kit 250	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Midipräparation	Qiagen, Hilden
Nickelsäulenaufreinigung Ni-NTA Spin	Qiagen, Hilden

2.2 Methoden**2.2.1 Zellkultur**

Für die Experimente wurden *Spodoptera frugiperda* (Sf9) Zellen verwendet, die aus den Ovarien von *Spodoptera frugiperda* gewonnen wurden. Die Kultivierung erfolgte in TC-100 Insect Medium, das 10% fetales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin enthielt. Die Sf9-Zellen wurden im Brutschrank bei 5% CO₂ und 27°C gezüchtet. Die höchste erreichte Zellpassage betrug 45. Sämtliche Lösungen und Medien, die für die Zellkultur verwendet wurden, wurden durch Sterilfiltration in einen keimfreien Zustand versetzt. Die Arbeiten in der Zellkultur erfolgten unter einer sterilen Arbeitsbank mit laminarer Verdrängungsströmung. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch mehrfaches Aufpipettieren mit Wachstumsmedium und Abspülen des Bodens der Zellkulturflasche. Nach einem 10minütigen Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur und 800 rpm wurde das Pellet in 10 ml frischem sterilem Medium gelöst und mit Hilfe des Casy 1 die Zellzahl bestimmt. Für weitere Versuche konnte so die erforderliche Zellzahl eingestellt werden.

Einfrieren und Auftauen von Sf9-Zellen

Um eine kontinuierliche Zellkultur aufrechtzuerhalten, wurden regelmäßig Sf9-Zellen mit niedriger Passagezahl eingefroren und später wieder aufgetaut.

Zur Vorbereitung vor dem Einfrieren von Sf9-Zellen wurden Zellen verwendet, die einen Tag zuvor gesplittet wurden, d.h. der Zellrasen war zur Zeit der Ernte subkonfluent. Nach dem Ablösen der Zellen und Überführung in ein steriles 50 ml Röhrchen wurden die Zellen 10 min bei 800 rpm und RT zentrifugiert. Zum Einfrieren musste ein spezielles Medium hergestellt werden, das zu 90% aus Insektenzellmedium und zu 10% aus DMSO bestand. Das Pellet wurde in 1 – 2 ml von diesem Medium gelöst und in 1 ml Portionen in Kryoröhrchen überführt. Um die Zellen schonend einzufrieren, wurden die Kryoröhrchen in einer Styroporbox über Nacht in –80°C Gefrierschrank aufbewahrt und erst danach in flüssigem Stickstoff gefroren.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff genommen und unter fließendem, kalten Wasser aufgetaut. Unter der Sterilbank wurde die Zellsuspension in ein steriles 15 ml Röhrchen überführt und dann 8 min bei 800 rpm bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3-5 ml sterilem Medium gelöst und in einem Loch einer 6-Lochplatte ausgesät. Nach 1 – 3 Tagen können die Zellen dann in eine kleine Zellkulturflasche überführt, um weiter kultiviert zu werden.

2.2.2 cDNA-Herstellung

2.2.2.1. RNA-Extraktion

Die cDNA, die als Vorlage für die nachfolgende Polymerase-Kettenreaktion diente, wurde mittels reverser Transkription aus RNA von humanen Retinoblastomzellen erstellt. Diese cDNA stand aus Vorversuchen zur Verfügung.

2.2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich ein gewünschtes DNA-Fragment stark zu vermehren. Die Polymerase synthetisiert Nukleinsäuren, indem sie Nukleotide miteinander verknüpft, deren Basen komplementär zu den Basen einer Matrize sind. Die Synthese erfolgt in 5´-3´Richtung, da jedes Nucleotid eine freie 3´-OH-Gruppe benötigt, um eine Phosphodiesterbindung ausbilden zu können. Daher kann die Synthese nur beginnen, wenn ein kurzer doppelsträngiger Bereich mit einer freien 3´-OH-Gruppe, ein sogenannter Primer, vorhanden ist. Die

temperaturstabilen DNA-Polymerasen stammen aus Bakterien wie z.B. *Thermus aquaticus* („Taq-Polymerase“). Zusätzlich benötigt man sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) und die Ausgangs-DNA, das sogenannte Template.

Die Reaktion erfolgt in drei Schritten:

1. Denaturieren des Templates
2. Hybridisierung der Primer mit dem einzelsträngigen Template (Annealing)
3. Verlängerung der hybridisierten Primer durch die Polymerase

PCR zur Herstellung der cDNA mit Hilfe der reversen Transkriptase

Die reverse Transkriptase ist ein Enzym aus Retroviren, das in vitro aus RNA einen komplementären DNA-Strang schreiben kann. Sie besitzt Polymeraseaktivität, eine 5'-Exoribonucleaseaktivität und eine Ribonuclease-H-Aktivität, die RNA von 3' nach 5' hydrolysiert.

Standard-PCR-Ansatz:

3 µg RNA (je nach Verdünnung)
3 µl Primer-Mix
6 µl dNTPs
3 µl 10x Reaktionspuffer
3 µl Reverse Transkriptase
ad 30 µl H₂O

Die reverse Transkription wurde nach dem unten angeführten Standardschema durchgeführt:

75 Minuten bei 37° C
5 Minuten Inaktivierung bei 80° C

2.2.3 PCR-Amplifikation der spezifischen Sequenz

Die Amplifikation der spezifischen cDNA aus der RT-PCR erfolgte mit dem unten aufgeführten Standard-PCR-Ansatz:

5 µl cDNA
4 µl Primer-Mix

2 µl dNTPs
 5 µl 10x Reaktionspuffer

 21 µl H₂O

Die Amplifikation wurde nach dem unten aufgeführten Standardschema durchgeführt:

3 min	95°C	initiale Denaturierung
1 min	95°C	Denaturierung
1 min	60°C	Annealing
1 min	72°C	Extension
7 min	72°C	final extension

2.2.4 Gel-Elektrophorese

Viele Biomoleküle, z.B. Proteine oder Nukleinsäuren, enthalten geladene oder ionisierbare Gruppen. Aufgrund ihrer Ladung können sie mittels Elektrophorese in einem elektrischen Feld gerichtet bewegt werden. Diese Eigenschaft nutzt man zur Trennung von Nukleinsäuren. Nukleinsäuremoleküle wandern aufgrund ihrer negativen Ladung, die durch die Phosphatgruppen im Phosphodiesterückgrat zustande kommt, zur Anode. Die Anode ist der positive Pol eines elektrischen Stromkreises, der bei einer Elektrophorese an das Gel angelegt wird. Bei dem Gel handelt es sich um Agarose-Gele. Agarose ist ein pflanzliches Polysaccharid, welches im Gel netzähnliche Strukturen bildet, durch die die DNA-Fragmente während der Elektrophorese wandern. Aufgrund unterschiedlicher Größe bei gleicher Ladung bewegen sich die Moleküle unterschiedlich schnell im elektrischen Feld. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente werden unterschiedliche Agarose-Gele (0,5 bis 2%) benutzt.

Herstellung des 1x Agarose-Gels:

1,5 g Agarose
 150 ml 0,5fach TBS
 15 µl Ethidium Bromide

Das hergestellte Gemisch wurde erhitzt bis es homogen flüssig war, d.h. die Agarose sich gut gelöst hatte und wurde dann in einen Gelschlitten gegossen. Nach etwa 30 Minuten war das Gel ausgehärtet und bereit zum Auftragen der Proben. Nachdem 10 µl der Proben mit 3 µl des PCR Auftragspuffer in einer 96-Lochplatte gemischt wurden, wurden die Proben in die Taschen aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Marker ebenfalls aufgetragen, um später die Höhe der Bande und damit die Größe des Produkts beurteilen zu können. An das Gel wurde eine Spannung von 100 V für 2 Stunden angelegt. Unter der UV-Lampe konnte dann das Gel photographiert werden.

2.2.5 Ligation in pcDNA 3.1

pcDNA 3.1 ist ein Vektor, der 5.4 kbp groß ist und der neben der multiplen „cloning site“ auch ein Ampicillin-Resistenzgen enthält. Um die hergestellte cDNA in DH5α-Zellen transformieren zu können, benötigt man den Vektor als Vehikel. Der Vektor liegt zunächst in geschlossener Form vor und muss genauso wie die cDNA vorbehandelt werden. Die cDNA, die „fremde“ DNA, wird Insert genannt, da es sich um die DNA handelt, die in das Gen bzw. den Vektor eingefügt werden soll. Dazu werden zu dem Vektor pcDNA 3.1 die Enzyme EcoRI und BamHI hinzugefügt. Diese Enzyme schneiden den Vektor pcDNA 3.1 an der für jedes Enzym spezifischen Sequenz. Im nun geöffneten Zustand ist es möglich das Insert, das zuvor ebenfalls mit EcoRI und BamHI vorbehandelt wurde, mit Hilfe der Ligase T4 einzufügen. Nur durch die Vorbehandlung durch dieselben Enzyme passt das Insert genau in den Vektor pcDNA 3.1. Das molare Verhältnis von pcDNA 3.1 (5400 bp) zu Gβ3 (1200 bp) war bei dem Ligationsansatz besonders zu beachten, d.h. es musste die 5fache Menge des Inserts im Vergleich zum Vektor eingesetzt werden.

Ligationsansatz:

- 500 ng Insert
- 100 ng Vektor
- 3 µl Puffer
- 1 µl Ligase T4
- ad 30 µl H₂O

Die Ligation dauerte 5 Stunden im Thermomixer bei 18°C. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Ligase, indem der Ansatz 5 min auf 70°C erhitzt wurde. 10µl der Probe wurden nun zur Transformation in DH5α-Zellen eingesetzt.

2.2.6 Transformation in DH5α-Zellen und Amplifikation

Die Transformation liefert die Möglichkeit kleine Plasmide in einen Bakterienstamm zu überführen. Die DNA wird in kompetente Zellen z.B. DH5α-Zellen transformiert. Kompetente Zellen erlauben der DNA durch Poren oder Kanäle in der Zellwand und Membran in die Zelle einzudringen und in die Zell-DNA zu integrieren.

In ein Eppendorfgefäß wurden 20 µl DH5α-Zellen unter der Sterilbank eingefüllt. Jeder weitere Schritt erfolgt auf Eis. Nun wurden 10µl des Ligationsmix zu den Zellen pipettiert und vorsichtig gemischt. Nach einer 30minütigen Inkubationszeit auf Eis wurde das Gemisch für exakt 40 sec bei 42°C erwärmt und wiederum für 2 min auf Eis gestellt. Im Anschluß wurden 80µl SOC-Medium unter der Lamina bei RT hinzugefügt und dann im Thermomixer 1 Stunde bei 37°C vorsichtig geschüttelt. Anschließend erfolgte das Ausstreichen von etwa 30-40 µl Probe auf Nährplatten, die LB-Agar mit Ampicillin enthielten. Über Nacht wurden die Agarplatten bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

Am darauffolgenden Tag wurden die gewachsenen Einzelklone gepickt und amplifiziert.

2.2.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde vom Sequenzierservice der Medizinischen Fakultät Essen vorgenommen. Zur Kontrolle wurden die hergestellten Sequenzen mit den gewünschten Sequenzen verglichen. Nur wenn die Sequenzen übereinstimmten, wurde die hergestellte DNA weiterverwendet.

2.2.8 Restriktion

Restriktionsenzyme schneiden die DNA normalerweise an spezifischen Stellen, die eine kleine, in der Regel vier bis acht Basenpaare (bp) lange, enzymespezifische Erkennungssequenz enthalten. Die Enzyme können aus Bakterien isoliert werden, nach deren Stamm sie dann auch benannt werden, z.B.

Eco RI aus *Escherichia Coli*, oder Bam HI aus dem Bakterium *Bacillus amyloliquefacies*.

Allgemein gilt, dass 1 µg DNA unter optimalen Bedingungen in 1 h von 1 Unit Enzym bei der entsprechenden Temperatur verdaut wird. Die Restriktion wurde hier mit 5 Units Enzym/ µg DNA durchgeführt.

Jede hergestellte DNA wurde mit zwei Enzymen geschnitten, und die Reaktionen erfolgten nach untenangegebenen Standardschema.

Restriktionsmix:

50µl	DNA Probe
5µl	BAM H1
5µl	ECO R1
20µl	Tango 2x
20µl	Aqua dest

Nach 1-2 stündiger Inkubation bei 37°C im Thermomixer konnten die Proben auf ein Agarose-Gel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese die Restriktion überprüft werden.

2.2.9 Klonierung in pFastBac

Zur Vorbereitung der Baculovirusherstellung erfolgt zunächst die Einklonierung des Inserts in den bakteriellen Shuttle-Vektor pFastBac.

Der pFastBac Vektor besitzt:

- einen Polyhedrinpromotor (5´seitig)
- ein Gentamicin-Resistenzgen (5´seitig)
- ein Ampicillin-Resistenzgen
- eine multiple cloning site
- ein Polyadenylierungssignal (3´seitig)
- Konsensussequenzen (Tn7L, Tn7R)

Das Bacmid, das aus dem pFastBac-Vektor mit dem entsprechenden Insert besteht, wird anschließend in einen speziellen Bakterienstamm, den DH10-Zellen, transformiert. Diese Zellen enthalten bereits eine Kanamycin-Resistenzgen und das LacZα-Gen. Zusätzlich enthalten die Bakterien das Helferplasmid pMON7124,

das die enzymatische Ausstattung für die Transposition trägt. Transposition bedeutet die Übertragung von genetischem Material von Plasmid zu Plasmid.

Bei der Transformation der Bakterien mit pFastBac wird nur der Bereich zwischen den Konsensussequenzen Tn7L und Tn7R transponiert, da dieser Bereich die entsprechende genetische Information für ein gewisses Zielprotein beinhaltet. Durch die Transformation mit pFastBac sind die Bakterien gleichzeitig resistent gegen Kanamycin, Gentamycin und Tetracyclin. Gleichzeitig ermöglicht das LacZ α -Gen die Unterscheidung von Klonen, die das Bacmid enthalten und solchen, bei denen die Transposition nicht erfolgreich war. Durch die erfolgreiche Transposition wurde das LacZ α -Gen zerstört und die Klone konnten keine Lactose mehr herstellen, d.h. sie sind nach klassischer Blau/Weiß-Selektion weiß.

Zunächst erfolgte die Ligation des gereinigten Inserts in den pFastBac Vektor. Hierzu wurden jeweils 10 μ g pFastBac mit BamHI und EcoRI in einem Volumen von etwa 100 μ l geschnitten. Zur orientierenden Analyse wurde eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Damit bei der Ligationsreaktion eine Ligation des aufgeschnittenen Vektors oder eine Religation des mit BamHI/NotI bzw. BamHI/EcoRI ausgeschnittenen Inserts verhindert wurde, erfolgte eine Behandlung des geschnittenen Vektors mit alkalischer Phosphatase. Durch die Entfernung terminaler Phosphatreste wird eine Re-Ligation unmöglich, und erst das Insert, das terminale Phosphatreste aufweist, kann effizient in den Vektor einligiert werden. Die alkalische Phosphatase wurde direkt dem Restriktionsansatz zugesetzt, wobei für etwa 10 μ g Vektor 7 U alkalische Phosphatase verwendet wurde. Die Reaktionszeit betrug 60 min bei 37°C.

Anschließend wurde die geschnittene und mit alkalischer Phosphatase behandelte Vektor-DNA mit dem Qiaquick PCR Purification Kit von den Restriktionsenzymen gereinigt und konzentriert. Hierzu wurden 500 μ l des Puffers PB zu 100 μ l Restriktionsansatz des Vektors pipettiert und gemischt. QiaQuick-Säulen wurden anschließend in 2 ml Sammelröhrchen gestellt und mit der Mischung aus Puffer PB und Vektor-DNA bestückt und 60s lang bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Während dieses Schrittes bindet die DNA an die Anionenaustauschermatrix der Säule. Der Durchlauf wurde verworfen und 750 μ l des Waschpuffers PE auf die Säule aufgetragen, 5 min inkubiert und erneut 60 s lang zentrifugiert. Die leeren Säulen wurden erneut 60 s lang zentrifugiert, um letzte Spuren des Puffers zu

entfernen. Im Anschluß wurde zur Elution 50µl Tris-Puffer (pH 8,0; 20mM) aufgetragen und die Säulen nach 2minütiger Inkubation wie beschrieben 60 s lang zentrifugiert. Die Konzentration des Vektors wurde anschließend durch Agarose-Elektrophorese im Vergleich zu einer bekannten Menge eines Markers abgeschätzt.

Bei der Ligation in pFastBac ist zu berücksichtigen, dass der Vektor pFastBac etwa 4900 bp groß ist, während die Inserts der Gβ-Varianten etwa 1000 bp groß sind. Aus diesem Grund musste das Insert in 4-5 fachem Überschuß zugegeben werden. Zu etwa 100 ng geschnittenen Vektor wurde im Fall von Gβ3 500 ng Insert pipettiert, 3µl des 10fach Ligasepuffers zugesetzt und mit H₂O auf 29µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1µl (= 1U) T4 DNA-Ligase gestartet und 5 h lang bei 18°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch fünfminütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt. Die bei -80°C gelagerten kompetenten DH10Bac-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und à 5 µl in sterile Mikroreaktionsgefäße aliquotiert. Zu je 5µl DH10Bac-Zellen wurde 1ng Plasmid pipettiert und auf Eis 30 min lang inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße genau 40 s lang in einen auf 42°C vorgeheizten Wärmeblock gestellt und wieder 2 min lang auf Eis gestellt. Damit wurde die eigentliche Transformation beendet.

Im Anschluß wurde zu den Zellen 45µl SOC-Medium pipettiert und die Mischung 4 Stunden lang bei 37°C im Wärmeblock unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Während dieser Zeit konnten die erfolgreich transformierten Zellen das Resistenzgen exprimieren. Nachdem Verdünnungen 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} der Probe hergestellt waren, wurden je 100µl auf LB-Agarplatten, die Gentamycin, Kanamycin und Tetracyclin enthielten, ausgestrichen. Über Nacht wurden die Platten bei 37°C bebrütet. Am nächsten Tag konnten einzelne Klone mit autoklavierten Zahnstochern gepickt werden. Mit den einzelnen Klonen wurde etwa 5 ml flüssiges LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) in sterilen Plastikröhrchen angeimpft und über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator bebrütet. Gleichzeitig wurde von dem jeweiligen Klon eine PCR durchgeführt, in dem eine kleine Menge Klonmaterial direkt in die PCR-Reaktion eingesetzt wurde.

Klon-PCR-Ansatz

5µl	Klonmaterial
2µl	pFastBac_SE

2µl	pFastBac_AS
1µl	dNTPs
5µl	10x Reaktionspuffer
0,5µl	Taq-DNA-Polymerase
36,5µl	H ₂ O

Standardschema der Klon-PCR

5 min	94°C	initiale Denaturierung
35 Zyklen:		
1 min	95°C	Denaturierung
1 min	60°C	Annealing
1 min	72°C	Extension
10 min	72°C	final extension

Die PCR-Produkte wurden in einem 1 % Agarosegel mit Ethidium Bromide Zusatz aufgetrennt. Im Falle der erfolgreichen Ligation von Gβ3 erhält man ein PCR-Produkt von etwa 1200 bp und im Falle von Gβ3s oder Gβ3s2 von etwa 1070 bp.

Von Klonen, die beim PCR-Screening das erwartete Produkt ergaben, wurde aus den angezüchteten 5 ml Kulturen eine Plasmid-Minipräparation durchgeführt. Hierzu wurde das QIAprep Spin Miniprep-System nach Anweisungen des Herstellers benutzt. Die Bakterien aus der Übernachtskultur wurden durch 8minütige Zentrifugation bei 800 rpm bei RT pelletiert, das Medium entfernt und das Pellet in 250 µl Puffer P1 gut resuspendiert. Anschließend wurde 250µl des Puffers P2 zugegeben und das Mikroreaktionsgefäß 4-6 mal geschwenkt. In diesem Puffersystem kommt es zur alkalischen Lyse der Bakterien und zum Abbau von RNA durch die dem Puffer P1 zugesetzten RNase A. Nach maximal 5 min wurden 350µl der Neutralisierungslösung N3 zupipettiert und durch mehrfaches Schwenken des Gefäßes gemischt. Bei diesem Schritt kommt es zur Präzipitation von Debris und Proteinen. Das Reaktionsgefäß wurde 10 min bei 13.000 rpm und RT in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine QIAprep Säule aufgetragen, die in einem 2 ml Auffanggefäß platziert wurde. Dabei kommt es zur Bindung der DNA an die Anionenaustauschermatrix. Es folgte nun ein 60 sekündiger Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm – wie auch bei

allen folgenden Zentrifugationsschritten. Nachdem 500µl Puffer PB auf die Säule aufgetragen wurden, wurde wieder 60 sec zentrifugiert und das Eluat verworfen. Die Säule wurde anschließend mit 750 µl Puffer PE gewaschen und 60 sec zentrifugiert. Um die letzten Spuren des Puffers PE zu entfernen, wurde die leere Säule bei gleicher Einstellung noch mal zentrifugiert. Die DNA wurde abschließend in 50 µl Tris-Cl, pH 8,5 eluiert.

Die so gewonnene DNA wurde durch Restriktionsanalyse mit BamHI und NotI bzw. EcoRI analysiert und die Konzentration durch Vergleich mit einem Marker bekannter Menge abgeschätzt.

2.2.10 Baculovirusherstellung

Bei dem Baculovirus handelt es sich um das *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV), das spezifisch Insektenzellen befällt (Wichham et al. 1992) und nicht übertragbar auf Säugetiere oder Menschen ist. Rekombinante Baculoviren – wie sie im weiteren verwendet wurden – sind in der Außenwelt nicht existenzfähig, da ihnen essentielle Gene zur Herstellung einer Polyhedrinhülle fehlen. An der Stelle dieser Gene befindet sich nach Einklonierung das entsprechende Insert. Das Virus besitzt eine doppelsträngige zirkuläre DNA von 80 –200 kbp. Die Wildtypform ist 130 kbp groß.

2.2.11 Einzelklonselektionierung

Mit Hilfe der Methode des Plaque Assays – beschrieben in 2.2.12 – wurden Einzelklone für die Nachamplifikation hergestellt. Pro rekombinanter Virusspezies wurden etwa 10 Plaques mit autoklavierten Zahnstochern gepickt und in Eppendorfgefäße überführt, die je 1 ml steriles TC 100 Vollmedium enthielten, und über Nacht auf einem Rotationsschüttler bei 4°C inkubiert wurden. Das Auswaschen des Virus aus der Agarose war das Ziel dieser Inkubation. Um Einzelklone eines Virus sicher picken zu können, sollte ein Loch einer 6-Lochplatte nicht mehr als 30 Plaques aufweisen.

2.2.12 Nachamplifikationen

Für den ersten Amplifikationszyklus wurden 2×10^5 Sf9-Zellen in 1 ml Insektenmedium auf ein Loch einer 12-Lochplatte ausgesät. Nachdem die Zellen innerhalb von 1-2 h angewachsen waren, wurde etwa 200µl der aus der Agarose

ausgewaschenen Virussuspension zugesetzt. Die Zellen wurden 4 Tage lang bei 27°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Virusüberstand abgenommen, 45 s lang bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert, um die Zelldebris zu entfernen. Der Überstand mit den Viren wurde in ein steriles Röhrchen überführt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Da nach 4-5 tägiger Bebrütung laut Literatur der Virustiter optimal ist, aber eindeutige zytopathische Effekte mikroskopisch noch nicht sicher nachweisbar sind, wurden die Zellen noch weitere 2 Tage in frischem Medium bebrütet, um dann zu entscheiden, ob das gepickte Einzelvirus infektiös war.

Für die zweite Amplifikation wurden 5×10^6 Sf9-Zellen in 10 ml Insektenmedium auf einer 10 cm Platte ausgesät. Nach dem Anwachsen der Zellen wurden 200µl des Virusüberstandes aus der ersten Amplifikation zugegeben und unter gleichen Bedingungen wie zuvor inkubiert. Die Ernte des Virus erfolgt wiederum nach 4 Tagen. Der Überstand wurde durch Zentrifugation 8 min lang bei 800 rpm und 4°C von Zelltrümmern gereinigt. Der Überstand wurde in einem sterilen Röhrchen gesichert und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Der dritte Amplifikationszyklus erfolgte, wie alle weiteren auch, in einer 250 ml Zellkulturflasche mit ca. $1,9 \times 10^7$ Zellen. Diese wurden mit 200µl aus dem letzten Virusüberstand infiziert und nach 5 Tagen (Maximum der Virusproduktion) geerntet. Nach 8minütiger Zentrifugation bei 800rpm und 4°C wurde der Überstand gesichert und bei 4°C gelagert.

Zur Virustiterbestimmung erfolgten Plaque Assays. Die Amplifikation erbrachte einen Virustiter zwischen 3 bzw. 10×10^7 pfu/ml, der als Arbeitstiter völlig ausreichend war.

2.2.13 Plaque Assay

Sf9 Zellen wurden, wie bereits beschrieben, abgespült, gezählt und auf eine Zahl von 5×10^5 Zellen/ml Medium eingestellt. In jedes Loch einer 6-Lochplatte wurden 2 ml dieser Zellsuspension pipettiert, d.h. es befanden sich 1 Mio Zellen in einem Loch. Ein Tag nach der Aussaat wurde mikroskopisch überprüft, ob die Zellen einen subkonfluenten Zellrasen gebildet hatten. Zunächst wurde eine

Virusverdünnungsreihe von 10^3 bis 10^6 von der zu untersuchenden Baculovirusprobe hergestellt. Anschließend wurde das Medium von den Sf9-Zellen entfernt und pro Loch wurde 1 ml der Virusverdünnung zugefügt. Zum Vergleich wurde eine Positivkontrolle mit nicht-infizierten Zellen und eine Negativkontrolle, d.h. Zellen, die mit unverdünntem Virusstock infiziert wurden, mitgeführt. Für die Infektion der Sf9 Zellen durch die Viren wurde eine 1stündige Inkubationszeit im Brutschrank eingehalten. Es findet sich eine schematische Darstellung eines Plaque Assays in Abb. 2.1. und ein Foto eines Plaque Assays in Abb. 2.2.

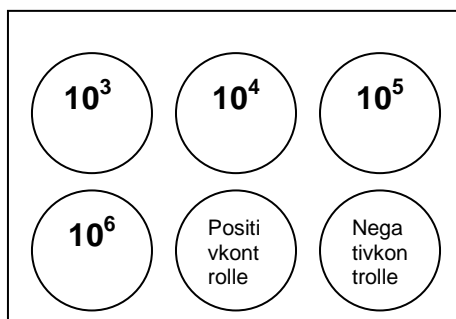


Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines Plaque Assays zur Titerbestimmung



Abb.2.2: Foto eines Plaque Assays zur Titerbestimmung

Während dieser Zeit wurden weitere Vorbereitungen getroffen. Die zuvor autoklavierte vierprozentige Low-melting Agarose wurde im Wasserbad auf 70°C bis zur vollständigen und homogenen Verflüssigung erhitzt. Zu 100 ml des 2x

Grace's Medium wurden 20 ml fetales Kalbserum hinzugefügt. In einem sterilen 50 ml Röhrchen wurden je zwei Volumenteile des 2x Grace's Medium mit einem Volumenteil sterilem Wasser gemischt und auf 40°C im Wasserbad erwärmt.

Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit wurde 1 Volumenteil der flüssigen Agarose zu der hergestellten Lösung aus Grace's Medium und Aqua dest hinzugefügt und gut durchmischt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit von 1 h wurde der Virusüberstand aus den Löchern möglichst vollständig abgesaugt und sofort mit je 2 ml der auf etwa 40°C abgekühlten Agarose-Mischung überschichtet. Die Platten wurden 20 min bei RT unter der Lamina belassen, damit die Agarose aushärten konnte, bevor sie zur Inkubation für 6-7 Tage in den Brutschrank bei 27°C gestellt wurden. Während dieser Zeit war besonders auf eine wassergesättigten Atmosphäre im Brutschrank zu achten.

Prinzip des Plaque Assays ist es, dass durch die hohe Virusverdünnung statistisch nur noch wenige Sf9-Zellen auf der 6-Lochplatte infiziert werden können. Innerhalb der 6 tägigen Bebrütung kommt es zu mehreren Vermehrungszyklen der Baculoviren, durch die die infizierten Zellen absterben. Durch die Fixierung der infizierten Sf9-Zellen mit Agarose wird die Ausbreitung des Virus über die ganze Platte verhindert. Die toten Zellen erscheinen als runde hellere Bereiche (Durchmesser von 0,5 bis 3 mm) als sogenannte Plaques. Diese können durch die Färbung mit Vitalfarbstoffen z.B. mit Neutralrot-Lösung deutlich sichtbar gemacht werden.

Hierzu wurden die Zellen nach 6-7 Tagen mit je 500 µl einer Neutralrot-Gebrauchslösung pro Loch überschichtet. Die Gebrauchslösung wurde aus einer Stammlösung mit einer Konzentration von 3,3 g/l gewonnen, in dem 1 ml Stammlösung mit 10 ml PBS verdünnt wurde. Die Gebrauchslösung wurde vor Gebrauch jeweils steril filtriert.

Nach einer Inkubation von 1-2 h im Brutschrank wurde die Neutralrotlösung vorsichtig abgesaugt und die 6-Lochplatten invertiert über Nacht im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag erschienen die Plaques als schwach angefärbte hellere Bereiche in einer tiefroten Umgebung, in der sich die vitalen Zellen befanden. Die Plaques wurden pro Loch ausgezählt und der Virustiter wie folgt berechnet:

$$\text{Titer (pfu/ml)} = \frac{\text{Verdünnung (z.B. } 10^6) \times \text{Anzahl der Plaques}}{\text{Viruszugabe in ml}}$$

2.2.14 Identitätsnachweis

Der Identitätsnachweis der einzelnen Viren erfolgt mit der Methodik der Membranpräparation, der Proteinbestimmung und des Western Blots.

2.2.14.1 Membranpräparation

Lösungen und Puffer für die Membranpräparation

Trypsin Inhibitor aus Sojabohnen – Stammlösung: 2 mg/ml
(„Soybean Trypsin Inhibitor“)

20 mg des Inhibitors wurden in 10 ml H₂O gelöst und bei 4°C gelagert.

PMSF-Stammlösung: 100 mM

1,74 g Phenylmethylsulfonylfluorid wurden in 100 ml Isopropanol gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

DTT-Stammlösung: 1M

Zur Herstellung der Stammlösung wurden 1,54 g DL-Dithiothreitol in 10 ml H₂O gelöst und bei 4°C gelagert.

MgCl₂-Stammlösung: 1M

20,3 g Magnesiumchlorid wurden in 100 ml H₂O gelöst und bei RT gelagert.

EDTA-Stammlösung: 0,5 M

18,6 g EDTA-Na-Salz wurden in 100 ml H₂O gelöst und auf pH 8 eingestellt.

Lysepuffer (100 ml)

MgCl ₂	150 µl aus 1M Stammlösung	1,5 mM
Saccharose	8,56 g	250 mM
ATP (Na-Salz)	0,055 g	1 mM
Benzamidin	0,047 g	3 mM

Trypsin Inhibitor	100 µl aus Stammlösung	2 µg/ml
PMSF	1 ml aus Stammlösung	1 mM
Tris	0,24 g	20 mM
pH 7,5		

Waschpuffer

EDTA-Na-Salz	200 µl aus Stammlösung	1 mM
DTT	100 µl aus Stammlösung	1 mM
Benzamidin	0,047 g	3 mM
Trypsin Inhibitor	100 µl aus Stammlösung	2 µg/ml
PMSF	1 ml aus Stammlösung	1 mM
Tris	0,242 g	20 mM
pH 7,5		

Für die Western Blots wurden Sf9–Membranen verwendet.

Die Zellen wurden durch Stickstoffkavitation lysiert. Das Prinzip der Methode besteht darin, dass Zellen in einer Stickstoffatmosphäre unter hohem Druck (50 bar) inkubiert werden. Dadurch kommt es zur physikalischen Lösung von Stickstoff in den Zellen. Wird der Druck plötzlich abgelassen, geht der Stickstoff in den Zellen wieder in die Gasphase über und es kommt durch die entstehenden Gasblasen zur Lyse der Zellen. Diese Methode gilt im allgemeinen als besonders schonend.

Ein bis zwei Tage vor der Membranpräparation wurden Sf9-Zellen in einer Zellkulturflasche nach Mediumwechsel mit einem MOI von 3 mit dem entsprechenden Baculovirus infiziert. Am Tag der Membranpräparation wurden die Zellen 10 min. lang bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 25 ml eiskaltem Medium resuspendiert. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Durch Stickstoffkavitation wurden die Zellen aufgeschlossen. Die in Lysepuffer resuspendierten Zellen wurden dazu 20 min. unter Rühren in einer Kavitationsanlage (Ashcroft Duralife, USA) auf einem Druck von 50 bar bei 4°C

äquiliibriert. Das dadurch entstehende Zellhomogenat wurde in 50ml-Röhrchen, die unter der Auslassdüse mit Parafilm verschlossen waren, aufgefangen und anschließend 10 min. lang bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet aus Zellkernen, Debris und nicht lysierten Zellen wurde verworfen. Der Überstand wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sorvall) überführt und 20 min lang bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Membranpellet in 100-300 µl eiskaltem Waschpuffer resuspendiert. Mittels mehrfacher Passage durch eine 21-G Kanüle wurden die Membranen homogenisiert. Danach wurde das Membranlysate auf 50 µl aliquotiert, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei –80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.14.2 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration lässt sich photometrisch nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmen:

$$C = E \times e^{-1} \times d^{-1}$$

C = Konzentration der Lösung
E = Extinktion
e = spezifischer Extinktionskoeffizient
d = Schichtdicke der Küvette

Mit Hilfe von Proteinstandards kann von der gemessenen Extinktion auf die Proteinkonzentration geschlossen werden.

Herstellung der Proteinstandards:

Lösung	Aqua dest	BSA	finale BSA Konzentration
1	125 µl	375 µl aus BSA-Lsg	1 500 µg/ml
2	325 µl	325 µl aus BSA-Lsg	1 000 µg/ml
3	175 µl	175 µl aus Lsg 1	750 µg/ml
4	325 µl	325 µl aus Lsg 2	500 µg/ml
5	325 µl	325 µl aus Lsg 4	250 µg/ml
6	325 µl	325 µl aus Lsg 5	125 µg/ml
7	400 µl	100 µl aus Lsg 6	25 µg/ml

Herstellung der Workingreagenz:

50 Anteile von Reagenz A wurden mit 1 Anteil von Reagenz B gemischt.

Von den Proben wurden je zwei Verdünnungen hergestellt. Für die erste Verdünnung 1 :10 wurden 5µl Probe zusammen mit 45µl Aqua dest verwendet, für die zweite Verdünnung 1:20 je 2,5 µl Probe und 47,5 µl Aqua dest. Als Leerwert wurde eine Probe mit 50µl Aqua dest mitgeführt.

Im Anschluß wurden zu jeder Probe, jedem Standard und dem Leerwert jeweils 1 ml der Workingreagenz hinzugefügt und bei 37°C 30 min lang im Thermoblock inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Messung der Extinktion bei 562 nm in Plastikküvetten. Die Extinktionswerte und Konzentrationsangaben der Proteinstandards erlauben nun eine Aussage über die Proteinkonzentration der Proben. Um die Daten verwerten zu können, sollte der Graph - Extinktion gegen Konzentration aufgetragen – linear sein. Anderenfalls ist keine Aussage über die Konzentration der Proben möglich.

2.2.14.3 Western Blot - SDS- Polyacrylamidgel- Elektrophorese

Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Elektrotransfer

Verschlußgel (Menge für 2 Blots)

- 3 ml Resolvingpuffer 8x
- 3ml Acrylamid 40 (29:1) rotiphorese
- 30 µl APS 10%
- 30 µl Temed

Da APS 10% und Temed die Starter der Härtungsreaktion sind, wurden sie stets als letztes hinzugegeben.

Trenngel

- 10 ml Resolvingpuffer 8x
- 24 ml Acrylamid 40 (29:1)
- 44,4 ml H₂O
- 0,8 ml SDS 10%
- 0,8 ml APS 10%
- 32 µl Temed

Sammelgel

2,5 ml: Sammelgelpuffer (Stocking Buffer)
 2,55 ml: Acrylamid 40 (29:1)
 14,55 ml: H₂O
 200 µl SDS 10%
 200 µl APS 10%
 20 µl Temed

8x Resolving Puffer: 363 g Tris
 480 ml HCl 1 N (o. 10 N HCl 48 ml)
 auf 1000 ml mit H₂O auffüllen → pH 8,8

Reservoirpuffer 10x Stock (Lauf Puffer):
 30,3 g Tris
 144 g Glycin
 10 g SDS
 auf 1 l mit H₂O; pH 8,3

Sammelgelpuffer: 30 g Tris (in 200 ml H₂O auflösen)
 (0,5 M Tris) pH 6,8 einstellen
 ad 500 ml H₂O

Transferpuffer: 12,12 g Tris
 57,6 g Glycin
 ad 2000 ml H₂O
 800 ml Methanol
 ad 4000 ml H₂O

Ponceau S Stock: Ponceau S 2% (1g)
 Trichteressigsäure 30% (15g)
 Sulfosalicylsäure 30% (15g)
 ad 50 ml mit H₂O

Ponceau S Gebrauchslösung:

Ponceau S Stocklösung 1:10 mit H₂O verdünnen

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese werden Proteine in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Um eine Wanderung im elektrischen Feld zu gewährleisten, die nur vom Molekulargewicht der Proteine abhängt, werden diese in Lämmli-Probenpuffer denaturiert. Sie lagern dabei eine ihrem Molekulargewicht proportionale Zahl an SDS-Molekülen an. Unter den verwendeten Pufferbedingungen sind SDS-Moleküle negativ geladen und werden mit den Proteinen durch das elektrische Feld bewegt. Die Auftrennung erfolgt durch die Interaktion mit den Poren der Gelmatrix: kleine Protein-Moleküle laufen am schnellsten, große Moleküle werden bei ihrer Fortbewegung stärker gehemmt.

Das Ausmaß der Separation hängt von der Konzentration der Polyacrylamidlösung ab. Dabei spielt auch das Verhältnis des Quernetzers Bisacrylamid eine Rolle. Je höher das Verhältnis Bisacrylamid : Acrylamid ist, desto kleiner werden die Poren des Polyacrylamidgels, und man erhält eine andere Auftrennung der Proteine. In allen Versuchen wurde ein Verhältnis 29:1 eingesetzt.

Bei festprozentigen Gelen besteht eine logarithmische Beziehung zwischen Molekulargewicht und Laufstrecke. In allen hier beschriebenen Versuchen wurden festprozentige Gele benutzt.

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese erfolgte in einer Vertikalelektrophoreseanlage der Firma Pharmacia/LKB, USA (Modell 2001; Plattengröße 16 x 18 cm). Die Gießvorrichtung wurde aus 2 Glassplatten (16 x 18 cm), 2 Abstandhaltern aus Kunststoff (1,5 mm dick), einem Gelgießstand, und 2 Befestigungsklemmen zusammengebaut.

Die zwei mit Wasser und SDS gereinigten Glasplatten wurden mit den Abstandhaltern auf den gewünschten Abstand gebracht, mit den Befestigungsklemmen fixiert, und in dem Gelgießstand eingespannt.

Als erstes wurde das Verschußgel mit Hilfe einer Plastiktransferpipette, als unterste Schicht in die Vorrichtung pipettiert. Nachdem das Verschußgel

ausgehärtet war (nach ungefähr 15 Minuten) wurde das Trenngel gegossen. Nachdem das Trenngel bis zur Grenze zum Sammelgel eingelaufen war, wurde das Gel mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet, um die Polymerisierung unter Sauerstoffabschluss zu ermöglichen. Nach 1 Stunde Aushärten wurde das Isobutanol abgegossen, die Reste mit Whatman Filterpapier entfernt, und die Sammelgelmischung eingefüllt. Mit der Hilfe von Kämmen wurden die Auftragstaschen im Sammelgel geformt. Nachdem das Gel für etwa 30 Minuten aushärtet war, wurden die Kämmen entfernt und der Marker sowie die Proteinproben wurden in die Taschen pipettiert.

Die Proben wurden nach der Proteinbestimmung in entsprechender Weise mit 3x Laemmli – Probenpuffer auf eine Konzentration von 2 µg/ µl, eingestellt. Danach wurden sie zur vollständigen Denaturierung 5 min lang auf 95°C erhitzt. Handelte es sich um Zellmembranpräparationen wurden 50 bis 150 µg Protein verwendet. Anschließend wurde die obere Gelkammer montiert. Um zu überprüfen ob die Konstruktion dicht war, wurde Reservoirpuffer in die obere Gelkammer geschüttet. Danach wurde der Gießstand entfernt und die ganze Vorrichtung in die untere Gelkammer gestellt. Obere und untere Gelkammer wurden mit 1x Reservoirpuffer (Laufpuffer) aufgefüllt.

Die Elektrophorese wurde über Nacht, bei einer Spannung von 50V durchgeführt. Wenn die Spannung erhöht wurde um die Elektrophorese zu beschleunigen wurde der Laufpuffer mit einer Kühlschlange auf 8°C gekühlt. Sobald das Bromophenolblau des Laemmli Probenpuffers das Verschlussgel erreicht hatte, wurde die Elektrophorese abgebrochen und das Gel aus der Apparatur entnommen.

2.2.14.4. Elektrotransfer

Um die gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine weiteren Analysen zugänglich zu machen, wurden sie aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembrane transferiert und immobilisiert. Dieser Transfer erfolgte als Nass-Elektrotransfer.

Dazu wurden die Gele aus der Elektrophoreseapparatur entnommen. Sammel- und Verschlussgel wurden entfernt. Zwischenzeitlich wurde die Nitrozellulosemembran mit Wasser benetzt und in Transferpuffer äquilibriert. Pro Gel wurden ebenfalls 2 Stücke Schaumstoff und 4 Stücke Whatman-Filter in Transferpuffer getränkt.

In einem Gelhalter der Transblot – Kammer der Firma BioRad wurde ein „Sandwich“ für den Elektrotransfer zusammengestellt: Schaumstoff – 2 Whatman 3MM Filter – Polyacrylamidgel – Nitrozellulose – 2 Whatman 3MM Filter – Schaumstoff. Der Gelhalter wurde fest geschlossen, so dass die einzelnen Komponenten fest in ihrer Position gehalten wurden. Anschließend wurde der Gelhalter in die Blotkammer gestellt und diese mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer wurde bei einer Stromstärke von 0,7 Ampere unter Kühlung auf 8°C durchgeführt und dauerte 1,5 Stunden. Danach wurde der Gelhalter zerlegt, die Nitrozellulose kurz in PBS gewaschen, und in Proteinfarbstoff Ponceau S 10 min lang unter leichtem Schütteln angefärbt. Hierbei handelt sich um eine reversible, wasserlösliche Färbung der Proteine auf der Membrane. Durch eine Fotokopie wurde der gleichmäßige Transfer dokumentiert, und das Proteinbandenmuster, sowie die Position der Markerbanden festgehalten. Danach folgte entweder gleich der Immunologische Nachweis, oder die Nitrozellulosemembrane wurde zwischen 2 Stücken Whatman – Filterpapier bei –20°C eingefroren und aufbewahrt.

2.2.14.5. Immunogischer Nachweis von Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran

Alle nachfolgenden Arbeiten wurden auf einem Schütteltisch bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Membran wurde zuerst 1 Stunde in Blockierlösung geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. Anschließend wurde die Membran viermal 5 Minuten lang in Waschlösung A gewaschen und dann 1 h mit dem Erstantikörper inkubiert, der mit einer geeigneten Verdünnung in Antikörperverdünnungslösung eingesetzt wurde.

Konzentrationen der verwendeten Antikörper:

Konzentration Erstantikörper		Konzentration Zweitantikörper
Gβcommon	1:12000	Anti-rabbit IgG 1:5000

Es wurde erneut fünfmal 5 min lang mit Waschlösung A gewaschen und dann 1 h lang im Zweitantikörper inkubiert. Danach schlossen sich 3 Waschschrte von jeweils 5 Minuten in Waschlösung A, und ein Waschschrte von 5 Minuten in 1x TBS-Lösung (Waschlösung B) an.

Immunreaktive Banden wurden mittels Chemilumineszenz nachgewiesen. Dazu wurde die Membran mit ECL – Lösung überschichtet, die aus den 2 Komponenten (Fa Amersham) in einem Verhältnis 1 : 1 angesetzt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 1 Minute wurde die ECL – Lösung abgegossen, und die überschüssige Lösung mit einem Whatman Papierfilter abgetupft. Die Membran wurde dann zwischen Klarsichtfolien in eine Kassette gelegt und in einem dunklen Raum mit einem Kodak X-Omat Film bedeckt. Die Expositionszeiten variierten je nach Antikörper, Proteinmenge und Gewebe.

Bei diesem Nachweisverfahren katalysiert die an dem Zweitantikörper gebundene Peroxidase die Oxidation des im ECL enthaltenen Luminols in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid.

Die Filme wurden anschließend 5 Minuten lang in einem Entwickler inkubiert, kurz gewässert, 5 Minuten in Fixierlösung fixiert, gewässert und getrocknet.

2.2.15 Infektion der Sf9-Zellen

Bei der Infektion von Sf9-Zellen für funktionelle Analysen und zum Erzielen hoher Expressionsraten wurden hohe Viruskonzentrationen verwendet, d.h. es wurde mit einem deutlichen Überschuß an Viren gearbeitet. Eine optimale „multiplicity of infection“ (=MOI) sollte zwischen 2 und 5 liegen. Hier wurde eine MOI von 3 gewählt, das heißt pro Zelle waren 3 Viren zur Infektion vorhanden.

2.2.16 Calcium-Messung

Sf9-Zellen verfügen nicht über endogene muskarinen Acetylcholinrezeptoren (mAChR). Durch eine Infektion mit entsprechenden Baculoviren werden die Sf9-Zellen angeregt, den M1-Acetyl-Cholin-Rezeptor herzustellen. Die gut untersuchte Kopplung des M1-Acetylcholinrezeptors an G-Proteine und ihrer Wirkungsweise über eine Stimulation der Phospholipase C, die über eine Freisetzung der second messenger Inositol-1,4,5-triphosphat und Diacylglycerol zu einer Kalziumausschüttung führt, wurde im Folgenden verwendet.

Die infizierten Sf9-Zellen reagieren nach Stimulation durch den spezifischen Agonisten Carbachol (CCh) über den oben beschriebenen Mechanismus mit einer

Calcium-Ausschüttung, die unter Verwendung Ca^{2+} -sensitiver Fluoreszenz-Farbstoffe gemessen werden kann.

2.2.16.1 Puffer und Lösungen für die Einzelzellfluorimetrie

Na-Hepes-Puffer	NaCl	135 mM	3,945 g
	KCl	5 mM	0,185 g
	MgCl_2	1 mM	0,1015 g
	CaCl_2	1 mM	0,055 g
	Hepes	20 mM	2,383 g
	D-Glucose	10 mM	0,99 g
			ad 500 ml Aqua
	pH 7,4		

Fura2-Acetoxymethylester 5mM

1mg Fura2-AM wurde in 200 μl DMSO gelöst und bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Carbachol 1mM

1,83 mg Carbachol wurden in 10 ml H_2O gelöst und bei -20°C gelagert.

Poly-L-Lysin-Lösung 12,5 $\mu\text{g/ml}$

5 ml Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) wurden in 35 ml H_2O gelöst und steril gefiltert.

PBS-Puffer	NaCl	8,67 g
	di- NaHPO_4	1,15 g
	KCl	0,2 g
	KH_2PO_4	0,2 g
	Wasser zur Injektion	ad 1000 ml

hergestellt in der Apotheke des Universitätsklinikum Essen

2.2.16.2 Durchführung der Calcium-Messung

Die Messung erfolgte auf runden Deckgläschen von 18 mm Durchmesser, die zuvor autoklaviert wurden. Eine 12-Loch-Platte wurde mit den Deckgläschen bestückt und anschließend wurde jedes Deckgläschen mit je 500 µl Poly-L-Lysin-Lösung überschichtet, um das Anhaften der Zellen zu erleichtern. Nach einer Inkubation von 20 min bei RT wurde der Überstand entfernt und je 0,5 Mio Sf9-Zellen pro Deckgläschen ausgesät.

Die Infektion wurde 15 min später mit einer Multiplicity of infection von 3 durchgeführt, d.h. 3 Viren pro Zelle. Die Zellen wurden danach 2 Tage weiterkultiviert.

Zur Vorbereitung der Messung wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen zweimal mit sterilem PBS-Puffer gewaschen. Mit sterilem Insekten-Medium, das den Fluoreszenzfarbstoff Fura2 AM in der Konzentration von 2µM enthielt, wurden die Zellen überschichtet und 30 Minuten mit Aluminiumfolie lichtgeschützt inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Deckgläschen in eine spezielle Halterung einmontiert, die mit Vaseline zuvor abgedichtet wurde. Um den Fluoreszenzfarbstoff aus dem Extrazellulärraum zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit 27°C warmen Na-Hepes-Puffer gewaschen. Zur endgültigen Messung wurde das Deckgläschen ebenfalls mit 500 µl Na-Hepes-Puffer bedeckt und mit der Deckglashalterung auf den thermostatisierten (27°C) Mikroskoptisch des Zeiss Axiovert 100-Fluoreszenzmikroskop gelegt. Die Fluoreszenzmessung erfolgt mit einem Video Imaging System unter Verwendung der Analysesoftware Attofluor Ratio Vision der Firma Atto Instruments. Während der Fluoreszenzmessung wird Licht in den Wellenlängen von $\lambda = 334$ nm und $\lambda = 380$ nm mit der Frequenz 2 Hz durch ein Ölimmersionsobjektiv (Fluar 40x/1,30 Zeiss) eingespiegelt und die Lichtemission bei $\lambda = 520$ nm mit Hilfe eines Monochromators und einer Videokamera gemessen und gespeichert. Das Prinzip der Messung beinhaltet, dass das Verhältnis der Emissionsintensitäten von Fura2-AM nach Anregung bei 334 nm und 380 nm proportional zum Logarithmus der freien intrazellulären Calcium-Konzentration ist. Unter den intrazellulären Ionenbedingungen beträgt der Kd-Wert von Fura2 für Ca^{2+} 224 nM (Grynkiewicz, 1985). Die Imaging-Anlage erlaubt dabei die räumliche und zeitliche Auflösung von Veränderungen der Ca^{2+} -Konzentration.

Entscheidend bei dieser Art von Calcium-Messung ist die Tatsache, dass diese Methode es erlaubt, einzelne Zellen separat zu messen. Die einzelnen Zellen können nach der Fokussierung mit einer Fläche als „Region of Interest“ markiert werden. Die optimale Empfindlichkeit der Kamera kann nun gewählt und die Hintergrundfluoreszenz subtrahiert werden. Im Mittel wurden pro Messung etwa 15 Zellen markiert.

Nach dem Start der Messung wurde gewartet bis die Zellen eine gleichmäßige Grundaktivität zeigten, bevor sie mit 0,1 μM , 1 μM oder 10 μM Carbachol stimuliert wurden. Durch Zugabe von Digitonin in einer Konzentration von 30 μM wurde die Messung beendet. Digitonin permeabilisiert die Zellmembran der Sf9 Zellen und setzt damit das komplette Calcium, dass sich in der Zelle befindet frei. Es wird das Maximalsignal gemessen. Das vorherige durch den Agonisten ausgelöste Calcium-Signal kann nun in Beziehung zu dem Maximalsignal gesetzt werden. Die aufgezeichnete Änderung der Emission und somit der Calciumkonzentration wird als Kurve dargestellt, wobei jede Kurve eine „Region of interest“, d.h. eine eingestellte Zelle zeigt.

2.2.17 Statistik und Grafik

Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Angegeben sind jeweils Mittelwert und Standardabweichungen eines Experimentes. Statistische Vergleiche erfolgten mit Hilfe des Tukey's Multiple Comparison Test und Unterschiede wurden bei einem $p < 0,05$ als statistisch signifikant erachtet. Die graphische Darstellung der Experimente und die statistischen Analysen erfolgten mittels dem Computerprogramm Graph Pad Prism der Firma Graph Pad Software, San Diego, USA.

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis der Expression rekombinanter Proteine nach Infektion von Sf9-Zellen mit rekombinanten Baculoviren

Zunächst wurde mit Hilfe von Westernblot Untersuchungen sichergestellt, dass die rekombinanten Proteine nach Infektion von Sf9-Zellen mit den entsprechenden Baculoviren tatsächlich exprimiert werden, wie in Abb.3.1 dargestellt.

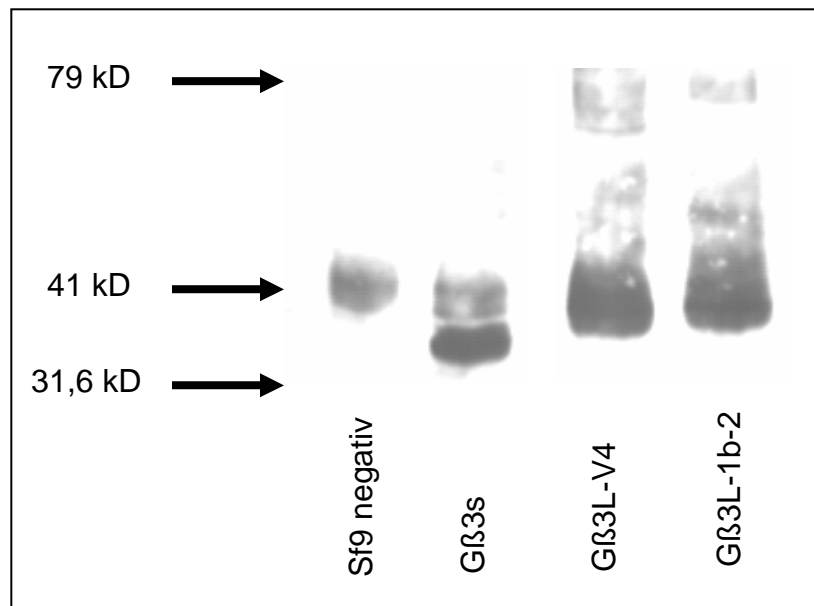


Abbildung 3.1: Westernblot-Analyse von G β -Untereinheiten nach Infektion von Sf9-Zellen mit rekombinanten Baculoviren (Antikörper G β common, Verdünnung 1:2000). G β 3L-V4 und G β 3L-1b2 sind rekombinante Proteine unterschiedlicher Herstellungsreihen.

Die Expression der G β 3L-Untereinheit (Wildtyp) sowie die Expression der G β 3s-Untereinheit konnte hierdurch bewiesen werden. Die G β 3s-Untereinheit zeigt ein niedrigeres Molekulargewicht von ~ 33 kD im Vergleich zur Wildtyp-Variante G β 3L, die etwa 36 kD besitzt.

Zwischen den Banden der beiden verschiedenen G β 3-Untereinheiten sind keine quantitativen Unterschiede festzustellen. Folglich werden funktionelle Unterschiede zwischen G β 3L und G β 3s in weiteren Untersuchungen nicht auf grobe Unterschiede in der Expression dieser Proteine zurückzuführen sein.

3.2 Funktionelle Untersuchungen von Sf9-Zellen mittels Calcium-Messung zur Etablierung der Messmethode

3.2.1 Stimulation von nicht-infizierten Sf9-Zellen durch Clonidinzugabe

Die erste Serie von funktionellen Untersuchungen wurde durchgeführt, um die Messmethode zu etablieren und zu optimieren. Für diese Untersuchungen wurden die Kalzium-Emission von Sf9-Zellen, die bereits mit Fura-2 AM überschichtet waren, vor, während und nach Stimulation durch Clonidin gemessen.

An dieser Stelle muss daraufhingewiesen werden, dass im folgenden immer die Emission der Zellen nach der Überschichtung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM mit dem Axiovert Fluoreszenzmikroskop gemessen wurden. Fura-2 AM bindet an freie Kalziumionen im Zytosol der Zelle. Deshalb darf von der Fluoreszenz auf die Kalziumkonzentration im Zytosol der Zelle geschlossen werden. Noch zu erwähnen bleibt, dass die Ergebnisse in Relationen bzw. Ratios angegeben werden und nicht in absoluten Kalziumwerten.

Zu Beginn der Messung zeigten die Sf9-Zellen einen basalen Kalziumspiegel („Grundaktivität“), der nach Stimulation von Clonidin rapide anstieg und kurze Zeit später wieder zum basalen Kalziumspiegel zurückkehrte. Clonidin ist ein Agonist, der über endogene, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der Sf9-Zellen wirkt. Die Kalziumkonzentration der Zelle stieg auf diesen Stimulus hin an. Sobald die Zellen ihre Grundaktivität wieder erreicht hatten, wurden sie durch Digitonin lysiert. Digitonin setzt in diesem Fall durch die Lyse der Zellmembran und der intrazellulären Membranen das gesamte Kalzium der Zelle frei. Setzt man nun die gemessenen Höhe des Clonidinsignals in Relation zu der Höhe des Digitoninsignals, kann man die prozentuale Reaktion der Zelle nach Stimulation mit Clonidin errechnen. Man erhält also nun die prozentuale Kalziumfreisetzung der Zelle auf einen Stimulationsreiz. Eine solche Fluoreszenzmessung ist beispielsweise in Abb. 3.2. dargestellt.

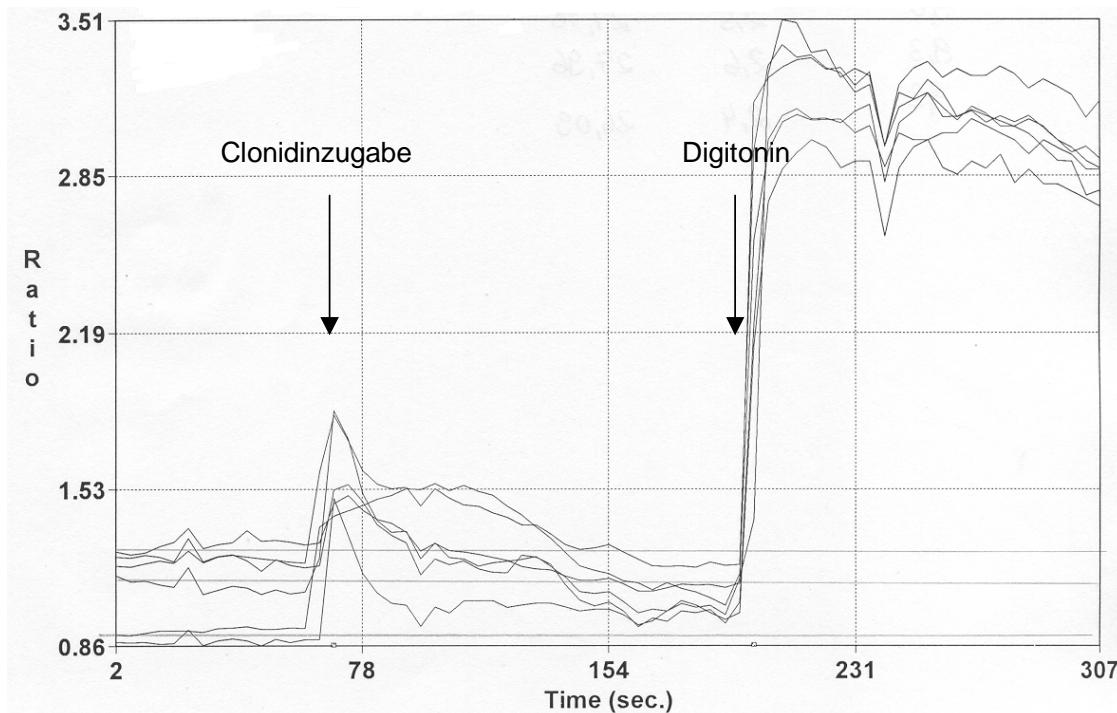


Abb. 3.2: Fluoreszenz-Messung nicht-infizierter Sf9-Zellen nach Stimulation mit $1\mu\text{M}$ Clonidin und anschließender Zellyse durch $30\mu\text{M}$ Digitonin

Die Abbildung zeigt den typischen Verlauf von Messkurven mehrerer Zellen während der Kalziummessung mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops. Der erste Pfeil zeigt die Zugabe von Clonidin an. Während der Zugabe von Clonidin stieg die intrazelluläre Kalzium-Konzentration in sehr kurzer Zeit um ein Vielfaches steil an und fiel danach langsamer wieder ab. Es handelt sich in diesem Fall, um eine Freisetzung von Kalziumionen aus intrazellulären Kalziumspeichern. Der zweite Pfeil zeigt den Zeitpunkt der Digitoninzugabe. Die intrazelluläre Kalzium-Konzentration stieg ebenfalls schnell steil an und erreichte ein Maximum, welches der maximalen Kalziumkonzentration der Zelle gleich zu setzen ist.

Um die Messmethode weiter zu etablieren, wurden diese Messungen mehrfach an verschiedenen Messtagen wiederholt. Da alle Sf9-Zellen in gleicher Weise auf die Stimulation reagierten, kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse tatsächlich aufgrund der Zugabe des Stimulus zustande kamen. Andere mögliche Einflußfaktoren wie zum Beispiel Raumtemperatur, Beschichtungszeit mit dem Fluoreszenzfarbstoff wurden durch Konstanthaltung so weit wie möglich in ihren Auswirkungen reduziert.

3.2.2 Vergleich der Grundaktivität der Sf9-Zellen

Um die später gezeigten Ergebnisse vergleichen zu können, wurde sicher gestellt, dass die Sf9-Zellen immer vergleichbare Basiswerte der intrazellulären Kalzium-Konzentration zeigen. Dazu wurden die Skalenwerte der Basalwerte von Sf9-Zellen verglichen, die mit verschiedenen Baculoviren infiziert waren. Im folgenden wurden Sf9-Zellen, die mit einem leeren Baculovirus infiziert wurden, mit Sf9-Zellen, die mit G β 3L, G β 3s oder G β 3s2-Baculoviren infiziert wurden, gegenübergestellt.

	WT	beta3L	3s	3s2
Anzahl	197	200	200	173
Minimum	0.3900	0.4600	0.4300	0.4504
25% Perzentile	0.8800	0.8810	0.7868	0.7650
Median	0.9786	0.9963	0.9907	0.9800
75% Perzentile	1.119	1.118	1.136	1.130
Maximum	1.453	1.520	1.456	1.554
Mittelwert	0.9813	0.9874	0.9616	0.9606
Standardabweichung	0.2070	0.1909	0.2372	0.2665
Standardfehler	0.01475	0.01350	0.01677	0.02026
Unteres 95% KI	0.9522	0.9607	0.9286	0.9206
Oberes 95% KI	1.010	1.014	0.9947	1.001

Tabelle 3.1: Vergleich der Basal-Werte

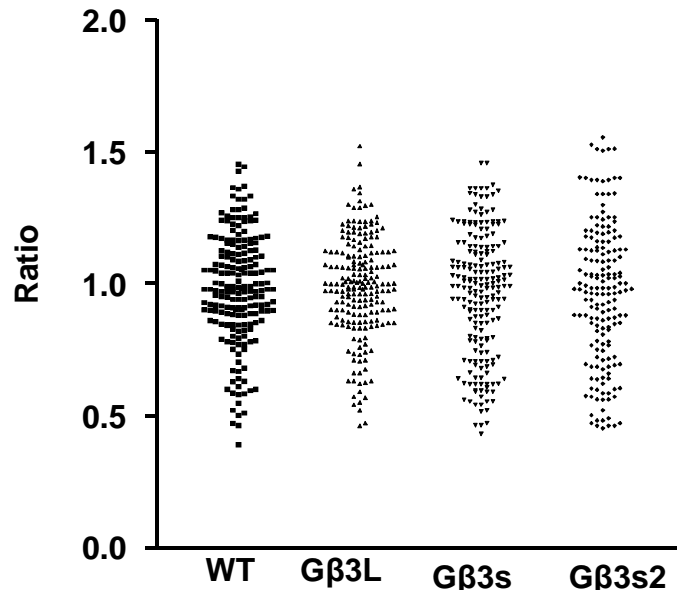


Abb. 3.3: Basal-Werte der Ca^{2+} -Messungen unterschiedlicher Zellen

Statistische Auswertung:

Im ANOVA Test sind die Mittelwerte nicht signifikant verschieden. (p-Wert 0,552)

ANOVA

P-Wert = 0,5519, Gruppen = 3, F = 0,7006, $R^2 = 0,002736$

Tukey's Multiple Comparison Test	Mittlere Differenz	Q	P Wert	95 % Konfidenzintervall
WT vs Gβ3L	-0,006110	0,3812	P > 0,05	-0,06499 bis 0,05277
WT vs Gβ3s	0,01960	1,223	P > 0,05	-0,03927 bis 0,07848
WT vs Gβ3s2	0,02068	1,243	P > 0,05	-0,04043 bis 0,08179
Gβ3L vs Gβ3s	0,02571	1,610	P > 0,05	-0,03294 bis 0,08437
Gβ3L vs Gβ3s2	0,02679	1,616	P > 0,05	-0,03411 bis 0,08769
Gβ3s vs Gβ3s2	0,001078	0,06505	P > 0,05	-0,05982 bis 0,06198

Tab. 3.2: Statistische Auswertung der basalen Kalzium-Werte

Aus der Analyse der Daten ergibt sich kein Anhalt für eine unterschiedliche Verteilung der Werte, die die intrazelluläre Kalzium-Konzentration der mit verschiedenen Viren infizierten Sf9-Zellen anzeigen.

3.2.3 Vergleich der maximalen Kalzium-Aktivität der Sf9-Zellen

Um im weiteren die Ergebnisse vergleichen zu können, muss sicher gestellt sein, dass auch die maximale Kalzium-Aktivität der Sf9-Zellen, die mit der gesamten Kalziumkonzentration der Sf9-Zelle gleichzusetzen ist, vergleichbar ist. Dazu wurden die maximalen Ausschläge, die durch die Digitoninzugabe ausgelöst wurden, verglichen.

	WT	Gbeta3L	Gbeta3s
Anzahl	300	300	300
Minimum	1.240	1.211	1.187
25% Perzentile	1.767	1.784	1.799
Median	1.931	1.983	1.992
75% Perzentile	2.208	2.240	2.270
Maximum	2.830	2.590	2.747
Mittelwert	1.982	2.007	2.021
Standardabweichung	0.3091	0.3164	0.2943
Standardfehler	0.01785	0.01826	0.01699
Unteres 95% KI	1.947	1.971	1.988
Oberes 95% KI	2.017	2.042	2.055

Tabelle 3.3 : Vergleich der maximalen Kalzium-Aktivität der Sf9-Zellen nach Digitonin-Gabe

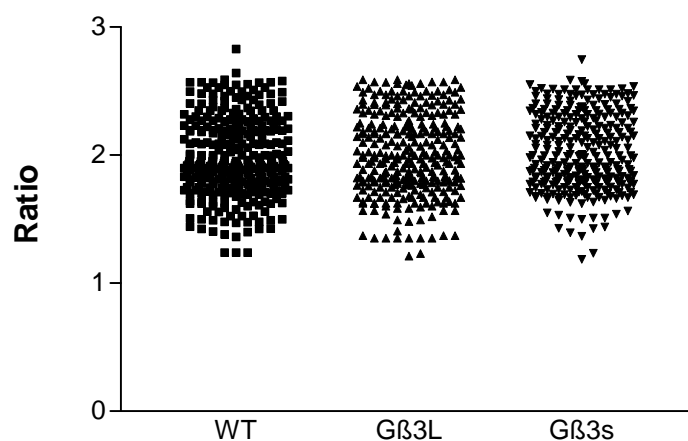


Abb. 3.4: Intrazelluläre Kalzium-Aktivität nach Digitonin-Gabe

Statistische Auswertung:

Im ANOVA Test sind die Mittelwerte nicht signifikant verschieden.

ANOVA

P-Wert = 0.2826, Gruppen = 3, $F = 1.265$, $R^2 = 0.002814$

In der Analyse sind keine signifikanten Unterschiede der maximalen Kalzium-Aktivität erkennbar. Somit sind die im weiteren aufgezeigte Effekte nicht auf einen Unterschied der maximalen Aktivität, d.h. der maximalen Kalziumkonzentration, zurückzuführen.

3.3 Effekt nach Infektion von Sf9-Zellen mit dem Baculovirus für den humanen M1-Acetylcholin-Rezeptor auf die funktionellen Untersuchungen

Als Negativkontrolle wurde eine Messreihe durchgeführt, bei der zu nicht infizierten Sf9-Zellen Carbachol hinzugegeben wurde. Wie auf der folgenden Abbildung zu erkennen ist, reagierten die Sf9-Zellen nicht auf eine Zugabe von Carbachol. Trotzdem wurde eine Zelllyse mittels Digitonin durchgeführt, wie in Abb.3.5. dargestellt.

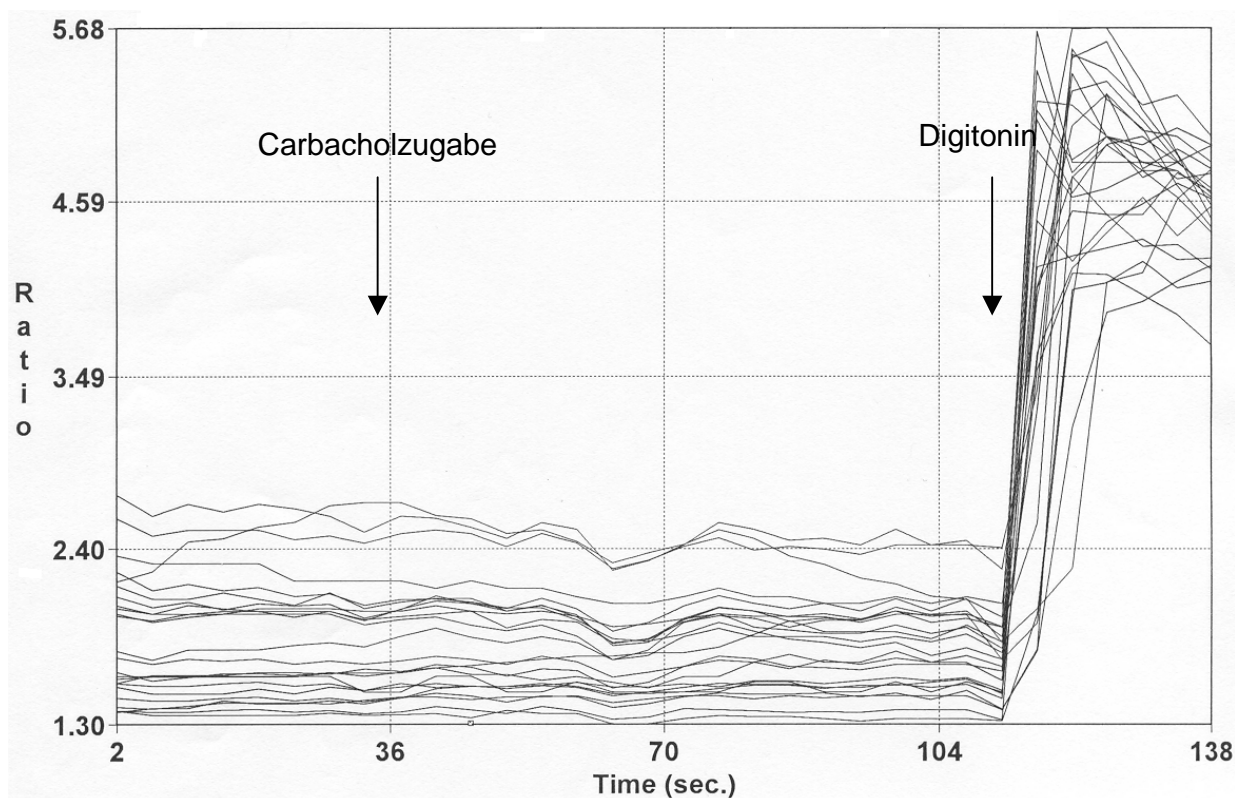


Abb. 3.5: Fluoreszenz-Messung von nicht-infizierten Sf9-Zellen nach Stimulation mit 10 μ M Carbachol und anschließender Zellyse durch Digitonin

Dies bedeutet, dass ohne Infektion mit einem Baculovirus keine Reaktion der Sf9-Zellen sichtbar wurde.

Nur wenn die Sf9-Zellen mit dem Baculovirus für den humanen M1-Acetylcholin-Rezeptor infiziert waren, reagierten sie bei einer Stimulation mit Carbachol mit einer Ausschüttung von Kalzium.

Im Rahmen der Etablierungs-Experimente wurden Dosis-Wirkungs-Untersuchungen an Sf9-Zellen, die mit dem Baculovirus für den humanen M1-Acetylcholin-Rezeptor infiziert wurden, durchgeführt.

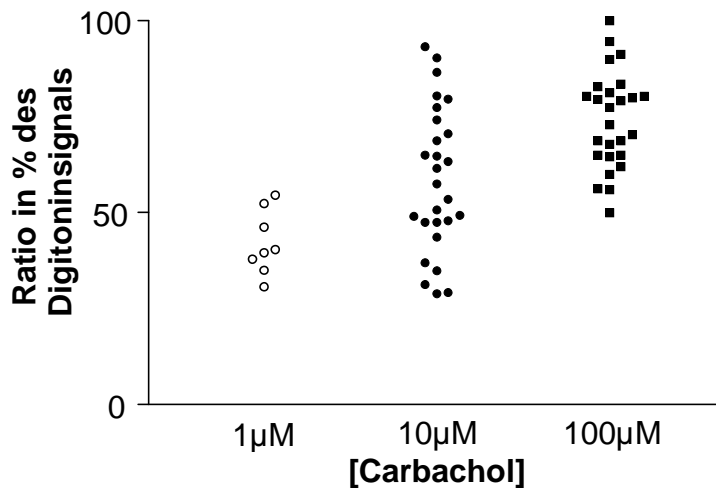


Abb. 3.6 Intrazelluläre Kalziumspiegel nach Stimulation des heterolog exprimierten M1-AchR in Sf9-Zellen durch Carbachol in verschiedenen Carbachol-Konzentrationen (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M)

	1 μ M	10 μ M	100 μ M
Anzahl	8	27	26
Minimum	30,77	28,98	50,00
25% Perzentile	36,57	47,58	64,86
Median	40,13	57,50	75,21
75% Perzentile	49,35	75,86	82,04
Maximum	54,64	93,30	100,0
Mittelwert	42,19	58,69	74,17
Standardabweichung	8,298	18,84	12,60
Standardfehler	2,934	3,626	2,471
Unteres 95% KI	35,25	51,24	69,09
Oberes 95% KI	49,13	66,14	79,26

Tabelle 3.4: Auswertung der intrazellulären Kalziumspiegel nach Stimulation mit drei verschiedenen Konzentrationen von Carbachol

ANOVA

P-Wert = $P < 0.0001$, Gruppen = 3, $F = 15,29$, $R^2 = 0,3452$

Tukey's Comparison Test	Multiple Differenz	q	P Wert	95% KI
1 μ M vs 10 μ M	-16,50	3,775	P < 0.05	-31.38 bis -1.625
1 μ M vs 100 μ M	-31,99	7,285	P < 0.001	-46.93 bis -17.04
10 μ M vs 100 μ M	-15,48	5,190	P < 0.01	-25.64 bis -5.330

Tabelle 3.5 Statistische Auswertung der intrazellulären Kalziumspiegel der drei verschiedenen Stimulations-Konzentrationen von Carbachol

Die Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Konzentration von Carbachol und der Höhe der Ausschüttung von Kalzium wurde damit bewiesen.

3.4 Funktionelle Untersuchungen von infizierten Sf9-Zellen mit den Baculoviren für den humanen M1-Acetylcholin-Rezeptor und für die humanen G β 3-Proteinuntereinheiten

Zunächst wurden Sf9-Zellen sowohl mit dem Baculovirus für den humanen M1-Acetylcholin-Rezeptor als auch mit dem Baculovirus für die entsprechende humane G β 3-Untereinheit koinfiziert. Dabei entspricht AcNPV dem Wildtyp der G β 3-Untereinheit. Bei der funktionellen Untersuchung wurden die Zellen jeweils mit 1 μ M Carbachol-Lösung stimuliert.

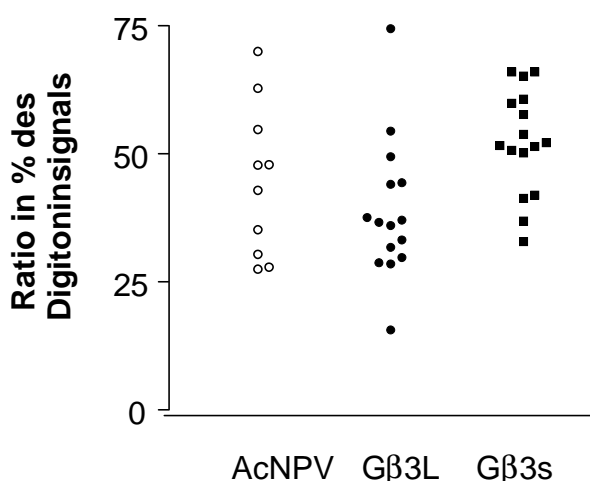


Abb. 3.7: Durch Carbachol (1 μ M) stimulierte Kalzium-Signale in Sf9-Zellen nach Infektion mit dem M1-AChR und verschiedenen G β 3-Varianten. Aufgetragen wurden die Mittelwerte der Einzelmessstage.

	WT	Gbeta3L	Gbeta3s
Anzahl	10	15	16
Minimum	27,44	15,68	32,91
25% Perzentile	29,18	30,79	46,09
Median	45,39	36,68	51,95
75% Perzentile	58,77	46,98	60,35
Maximum	70,06	74,50	66,01
Mittelwert	44,73	38,81	52,44
Standardabweichung	14,78	13,66	10,17
Standardfehler	4,675	3,527	2,541
Unteres 95% KI	34,15	31,25	47,03
Oberes 95% KI	55,30	46,38	57,86

Tabelle 3.6: Auswertung der intrazellulären Kalzium-Spiegel der verschiedenen Gβ3-Untereinheiten nach Stimulation mit 1μM Carbachol

ANOVA

P-Wert = 0,0432, Gruppen = 3, F = 2,945, $R^2 = 0,1672$

Tukey's Comparison Test	Multiple Differenz	Mittlere Q	P-Wert	95% KI
WT vs Gbeta3L	5,915	1,572	P > 0.05	-8.304 bis 20.13
WT vs Gbeta3s	-7,714	2,077	P > 0.05	-21.75 bis 6.326
Gbeta3L vs Gbeta3s	-13,63	4,116	P < 0.05	-26.15 bis -1.111

Tabelle 3.7: Statistische Analyse der intrazellulären Kalzium-Spiegel nach Stimulation mit 1μM Carbachol

Betrachtet man die Graphik und die Mittelwerte, so erkennt man Unterschiede zwischen den Signalen von Gβ3L und Gβ3s. Diese Unterschiede waren statistisch signifikant.

Im Vergleich von Gβ3L und Gβ3s kann man festhalten, dass es in Sf9-Zellen nach Infektion mit Gβ3s zu höheren Kalzium- Signalen kam.

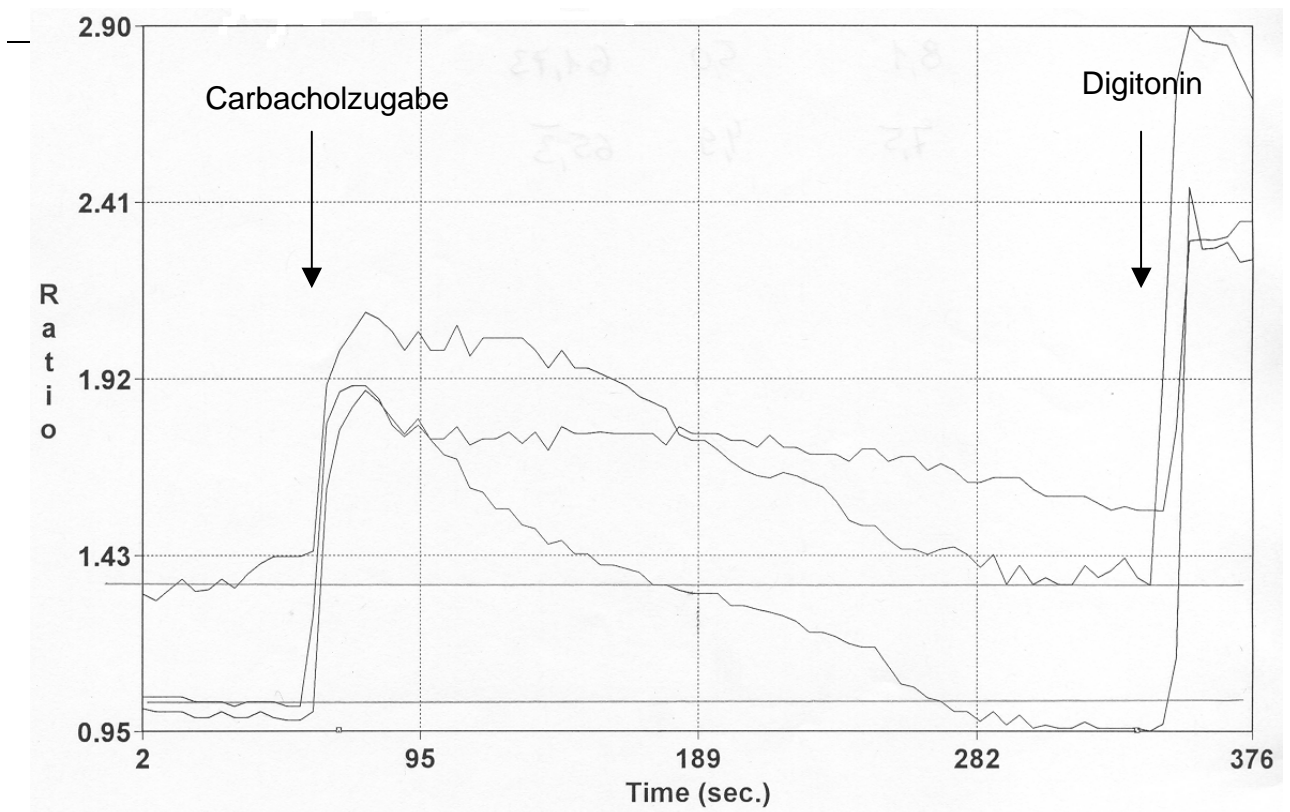


Abb. 3.8: Fluoreszenz-Messung nach Ko-Infektion mit den Baculoviren für den M1-Acetylcholin-Rezeptor und G β 3L nach Stimulation mit 10 μ M Carbachol und anschließenden Zellyse mit Digitonin

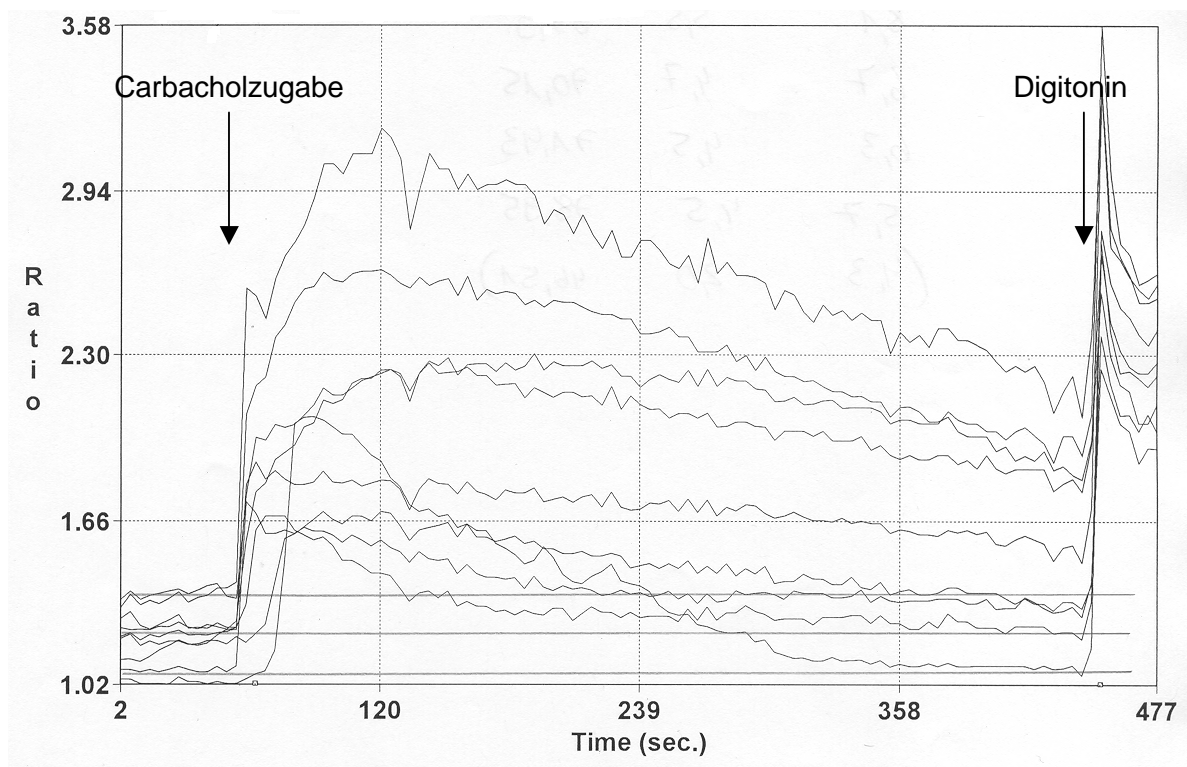


Abb. 3.9: Fluoreszenzmessung nach Ko-Infektion mit den Baculoviren für den M1-Acetylcholin-Rezeptor und G β 3s nach Stimulation mit 10 μ M Carbachol und anschließender Zellyse durch 30 μ M Digitonin

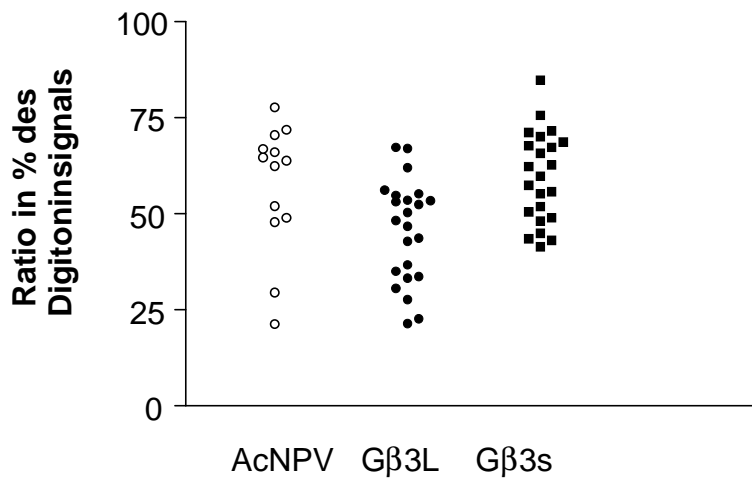


Abb. 3.10: Durch Carbachol (10 μ M) stimulierte Kalzium-Signale in Sf9-Zellen nach Infektion mit dem M1 AChR und verschiedenen G β 3-Varianten. Dargestellt sind die Mittelwerte der Einzelmessstage.

	WT	Gbeta3L	Gbeta3s
Anzahl	13	23	23
Minimum	21,47	21,65	41,62
25% Perzentile	48,61	34,53	49,85
Median	63,93	48,42	59,99
75% Perzentile	68,80	55,12	69,50
Maximum	77,78	67,36	84,91
Mittelwert	57,35	45,72	59,64
Standardabweichung	16,68	13,30	11,75
Standardfehler	4,628	2,774	2,450
Oberes 95% KI	47,27	39,96	54,56
Unteres 95% KI	67,43	51,47	64,72

Tabelle 3.8: Auswertung der intrazellulären Kalzium-Spiegel nach Stimulation mit 10 μ M Carbachol

ANOVA

P-Wert = 0,0025 (signifikanter Unterschied), Gruppen = 3, F = 5,277, R² = 0,1888

Tukey's Comparison Test	Multiple Differenz	Q	P-Wert	95% KI
WT vs Gbeta3L	11,63	3,298	P > 0.05	-1.523 bis 24.79
WT vs Gbeta3s	-2,289	0,6489	P > 0.05	-15.44 bis 10.87
Gbeta3L vs Gbeta3s	-13,92	4,645	P < 0.01	-25.10 bis -2.741

Tabelle 3.9: Statistische Analyse der intrazellulären Kalzium-Spiegel nach Stimulation mit 10 μ M Carbachol

Der Anova-Test zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied der intrazellulären Kalzium-Konzentration nach Stimulation mit Carbachol in Abhängigkeit der Infektion mit G β 3L oder G β 3s. Das Kalziumsignal der Zellen mit G β 3s war höher als das der Zellen mit G β 3L. Wichtig ist an dieser Stelle festzuhalten, dass die exprimierten Mengen der beiden G β 3 Varianten gleich sind. Ansonsten entspricht das Ergebnis der Stimulation mit 1 μ M Carbachol.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden G β 3-Untereinheiten zusammen mit dem M1-Acetylcholin-Rezeptor in Sf9-Zellen mit Hilfe des Baculovirussystems exprimiert, um im Folgenden funktionelle Untersuchungen vorzunehmen. Nach Stimulation des M1-Acetylcholin-Rezeptors mit Carbachol als Agonisten wurde die daraufhin freigesetzte Kalziummenge mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen untersucht.

Um die Ergebnisse im Folgenden zu diskutieren und interpretieren zu können, muss zunächst auf die Methodik der Arbeit eingegangen werden.

Das Sf9-Zellsystem verbunden mit dem Baculovirussystem ist ein häufig genutztes System zur Herstellung und Untersuchung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Glykoproteinen.

Untersuchungen des Systems in Bezug auf die Qualität der hergestellten Glykoproteine zeigten, dass die Aminosäuresequenz und Posttranslationsprozesse, zum Beispiel Faltung der Proteine, vergleichbar mit der Struktur humaner Proteine sind. Es gibt gewisse Unterschiede, zum Beispiel bei der N-Glykosylierung, die in der vorliegenden Arbeit keine Rolle spielt (Altmann et al., 1999). Während der hier beschriebenen Untersuchungen wurde durch Sequenzierung die Richtigkeit der hergestellten Proteine überprüft.

Die nächste Frage, die sich stellt ist die der Interaktion zwischen endogenen Insekten- und humanen, exprimierten Komponenten. Dass eine funktionelle gute Interaktion möglich ist, wurde nicht nur in dieser Arbeit beobachtet, sondern in Untersuchungen mit humanem G α 16-Protein und humanem D1-Rezeptor in Sf9-Zellen. Nach Expression der beiden Komponenten konnte die Interaktion mit endogenen G $\beta\gamma$ -Untereinheiten und endogener Phospholipase C nachgewiesen werden.

Um einen gut messbaren Parameter für die Signalantwort auf Stimulation zu haben, wurden in der vorliegenden Arbeit die Kalziumkonzentrationen mittels Fluoreszenz gemessen. Diese Änderung der Kalziumkonzentration ist verbunden mit einer Stimulation der Phospholipase C durch einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor G $_q$ und führt zunächst zu einer Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate zu Diacylglycerol und Inositol-1,4,5-triphosphat (Berridge and Irvine, 1989). InsP $_3$ agiert als intrazellulärer Second messenger, in dem es an spezielle InsP $_3$ -Rezeptoren, die am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind, aktiviert

und somit die Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum auslöst. Die Wiederaufnahme des freigesetzten Kalziums in das endoplasmatische Retikulum erfolgt mit Hilfe von ATP-abhängigen Kalzium-Pumpen. (Clapham and Neer, 1995)

Die Erhöhung der Kalziumkonzentration ist biphasisch: ein initialer Anstieg wird über die Inositol-1,4,5-triphosphat ausgelöste Freisetzung von Kalzium aus internen Speichern ausgelöst, während gleichzeitig eine Erhöhung der Konzentration durch einen Kalziumeinstrom aus dem Extrazellularraum stattfindet. In bereits bekannten Untersuchungen führte die Zugabe von Carbachol zu Sf9-Zellen, die zuvor mit dem rekombinaten Baculovirus für M₅-Rezeptor infiziert wurden, zu einer Erhöhung der Kalziumkonzentration. Carbachol hat keine Wirkung auf nicht-infizierte Sf9-Zellen. Die Ergebnisse einer anderen Untersuchung zeigen, dass die molekularen Mechanismen, die zu einer Kalziumkonzentrationserhöhung in Sf9-Zellen führen, denen der Säugetierzellen entsprechen. (Hu et al., 1994) Auch in der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass nicht-infizierte Sf9-Zellen auf eine Zugabe von Carbachol keine Reaktion zeigten.

Ob die Kalziumsignale, welche in der vorliegenden Arbeit gemessen wurden, nur durch eine Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum zustande kamen oder auch durch einen Kalziumeinstrom aus dem Extrazellularraum, ist nicht bewiesen. Für die hier zu diskutierenden Ergebnisse spielt dies keine Rolle.

Die basale Ca²⁺-Konzentration und die maximale Aktivität aller Zellen nach Lyse mit Digitonin, unabhängig davon mit welcher Gβ3-Untereinheit sie infiziert waren, wurden im Vergleich analysiert und zeigten keine Unterschiede. Ebenso wurden alle transfizierten Gβ-Untereinheiten in den Sf9-Zellen gleichermaßen gut exprimiert. Damit lassen sich Unterschiede bei den Ergebnissen nicht auf Unterschiede bei der Expressionseffizienz oder der basalen Kalziumkonzentration der Zellen zurückführen.

Bei den funktionellen Untersuchungen wurde deutlich, dass Sf9-Zellen, die den M1-Acetylcholin-Rezeptor und die Gβ3s-Untereinheit exprimierten mit einer signifikant höheren Kalzium-Ausschüttung reagierten als die Sf9-Zellen, die den

M1-Acetylcholin-Rezeptor und die G β 3L-Untereinheit – die Wildtypvariante – exprimierten.

Es gibt nun zwei unterschiedliche Möglichkeiten diese Ergebnisse zu interpretieren: Einerseits kann man die Kalziumausschüttung der Sf9-Zellen mit der G β 3s-Untereinheit als die „normale“ Reaktion werten, wobei dann die Reaktionsfähigkeit der Sf9-Zellen mit der G β 3L-Untereinheit als vermindert anzusehen wäre. Man könnte vermuten, dass die G β 3L-Untereinheit eine inhibitorische Funktion ausübt. Das heißt, sie bewirkt zwar eine Kalziumausschüttung aus dem endoplasmatischen Retikulum der Zelle, aber in einem geringeren Maße als dies die G β 3s-Untereinheit bewirkt.

Andererseits könnte die G β 3s-Untereinheit zu einer verstärkten Kalziumausschüttung führen, indem sie empfindlicher auf eine Rezeptorstimulation reagiert. In diesem Fall würde man davon ausgehen, dass die Reaktion der G β 3L-Untereinheit „normal“ wäre und die G β 3s-Untereinheit zu einem erhöhten Signal durch eine höhere Kalziumausschüttung in der Zelle führt. Bedenkt man die strukturellen Unterschiede der G β 3-Untereinheiten, ist es vorstellbar, dass die aus weniger Propellerblättern bestehende G β 3s γ -Einheit nicht so gut an die G α -Untereinheit bindet und aus diesem Grund nach Rezeptorstimulation leichter vom G α freigesetzt wird.

Für diese Theorie gibt es Anhaltspunkte aus anderen Untersuchungen, bei denen die G β 3s-Untereinheit ebenfalls zu einer erhöhten Signaltransduktion und erhöhtem Ionentransport geführt hat.

So fallen Zellen von Trägern mindestens eines 825T-Allels, z.B. immortalisierte Lymphoblasten oder Fibroblasten, durch den Phänotyp einer gesteigerten Signaltransduktion auf. Dazu gehört eine gesteigerte Aktivierbarkeit PTX-sensitiver G-Proteine, die sich in einer erhöhten durch Agonisten stimulierbaren GTP γ S-Bindung, gesteigerten IP $_3$ - und Ca $^{2+}$ -Signalen und einer vermehrten Zellproliferation äußert (Siffert et al., 1995; Pietruck et al., 1996; Siffert et al., 1998).

Bei Individuen, die das T-Allel für die G-Protein β 3-Untereinheit tragen, wurde eine erhöhte Plättchenaggregation nach Stimulation durch Adrenalin festgestellt. Dieses Ergebnis unterstützt ebenfalls die Hypothese, dass das 825T Allel ein

Marker für eine erhöhte Signaltransduktion in Stoffwechselwegen ist, bei denen G-Proteine beteiligt sind (Naber et al., 2000).

Außerdem wurde eine erhöhte durch N-formyl-methionyl-leucyl-phenoylalanine stimulierte Chemotaxis von Neutrophilen bei Trägern des 825 T-Allels festgestellt (Virchow et al., 1998).

Klinisch weisen Träger des 825T-Allels ein erhöhtes Risiko dafür auf eine essentielle Hypertonie zu entwickeln (Siffert et al., 1998; Schunkert et al., 1998). In weiteren Untersuchungen wurde ein erhöhtes Risiko für Bluthochdruck kombiniert mit Symptomen des metabolischen Syndroms wie Dyslipidämie, Hypercholesterinämie und Adipositas für 825 T-Allelträger festgestellt. Ebenso wurde ein erhöhtes Risiko für Arteriosklerose und dem damit verbundenen Risiko für Schlaganfälle und Myokardinfarkte in dieser Bevölkerungsgruppe nachgewiesen (Siffert et al., 2005). Mittlerweile konnte in Studien mit chinesischen Bevölkerungsgruppen die Assoziation zwischen dem GNB3 825T Allel und Hypertonie bzw. erhöhtem Risiko für Schlaganfälle nicht bestätigt werden. Dies ist möglicherweise auf die ethnischen Unterschiede zurückzuführen. Der Einfluss unterschiedlicher Umweltfaktoren ist ebenfalls zu bedenken (L Zhang et al., 2005).

Das 825T-Allel für GNB3 ist mit einer erhöhten renalen Perfusion bei früher Hypertonie assoziiert. Dies könnte relevant für die Pathogenese der essentiellen Hypertonie sein (Zeltner, 2001). Zusätzlich zu den bereits erwähnten Assoziationen mit Faktoren des metabolischen Syndroms ist bekannt, dass bei Trägern des 825T-Allels häufiger eine Insulinresistenz gefunden wird. Eine Assoziation zwischen 825T-Allel und Diabetes Typ 2 wird vermutet, da die Assoziation mit den Hauptrisikofaktoren Insulinresistenz und Adipositas aufgezeigt wurden. Dies bedeutet allerdings nicht, dass das 825T-Allel ausschlaggebend für die Entwicklung eines Diabetes Typ 2 ist, da Diabetes Typ 2 eine multifaktorielle Erkrankung ist. Trotzdem sind die Hauptfaktoren des metabolischen Syndroms wie Adipositas, Insulinresistenz und Hypertonie mit dem 825T-Allel assoziiert. Das bedeutet, es besteht ein höheres Risiko für 825T-Allel-Träger an einem metabolischen Syndrom zu erkranken (Roskopf et al., 2000). Das Risiko eine Nephropathie bei bestehendem Diabetes zu entwickeln ist bei 825T-Allelträgern ebenfalls erhöht (Siffert et al., 2000). Der C825T Polymorphismus des GNB3 Gens

beeinflusst auch die Entwicklung des Körpergewichts und Blutdruckes bei Frauen vor und in der Menopause. Homozygote T-Allelträgerinnen haben sowohl vor der Menopause als auch darin höher Blutdrücke und sind signifikant adipöser (Casiglia et al., 2008). Homozygote T-Allelträgerinnen mit Brustkrebs haben ein niedrigeres Risiko eine Knochenmetastasierung zu entwickeln als heterozygote C/T- oder CC-Trägerinnen (Clar et al., 2007). Homozygote 825T oder C Allelträger zeigen häufiger eine mahlzeitunabhängige Dyspepsie. Diese Assoziation lässt sich nicht allein mit dem T-Allel erklären (Camilleri et al., 2006).

Für das Herz sind ebenfalls Assoziationen mit dem 825T-Allel beschrieben. Es lässt sich eine Assoziation zwischen 825T-Allel und gesteigerter koronarer Vasokonstriktion nach α_2 -Adrenoceptor Aktivierung feststellen. Durch die erhöhte Vasokonstriktion traten bei 825T-Allelträgern häufiger myokardiale Ischämiezeichen in Form einer Angina pectoris auf (Baumgart, 1999). Das GNB3 825T-Allel ist assoziiert mit beeinträchtigter linksventrikulärer diastolischer Füllung bei hypertensiven Individuen. Eine beeinträchtigte linksventrikuläre diastolische Füllung ist ein früher Marker für eine hypertensive Herzkrankheit und bekannt dafür, dass es strukturellen Myokardveränderungen vorausgeht (Jacobi, 1999). Hypertensive Patienten, die das 825T-Allel tragen, haben häufiger eine linksventrikuläre Hypertrophie als hypertensive 825C-Allelträger. Dies passt gut zu der gemeinsamen Beobachtung von erhöhter G-Protein-Aktivität, $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauscher Aktivität, Zellwachstum und Proliferation bei hypertensiven 825T-Allelträgern (Poch, 2000). 825T-Allel-Träger zeigen nicht nur eine gesteigerte Koronarvasokonstriktion nach Injektion mit einem α_2 -Adrenorezeptor-Agonist, sie zeigen auch in Hautgefäßen eine vermehrte Vasokonstriktion nach Stimulation mit Noradrenalin, Angiotensin II und Endothelin I. 825T-Allel-Träger reagieren aufgrund dieser Unterschiede auch unterschiedlich auf verschiedene Medikamente. Zum Beispiel ist die Vasodilatation nach Gabe des ET_A Antagonisten BQ-123 bei 825T-Allelträgern erhöht im Vergleich zu 825C-Allelträgern. Valsartan inhibiert die lokale Vasokonstriktion in der Haut durch Angiotensin II und Endothelin 1 stärker bei T-Allelträgern (Mitchell et al., 2006). Ein anderes Beispiel ist die Blutdrucksenkung durch Hydrochlorothiazide, die bei 825T-Allelträgern wesentlich effektiver als bei 825C-Allelträgern ist (Siffert et al., 2003) und die erhöhte Ansprechrate auf Sildenafil bei homozygoten T-Allelträgern mit erektiler Dysfunktion (Sperling et al., 2003). Weitere Beispiele für die Einflüsse

des C825T-Polymorphismus auf die Medikamentenwirksamkeit sind das bessere Ansprechen auf die Behandlung mit typischen Neuroleptika bei T-Allelträgern, die unter Schizophrenie leiden (Anttila et al., 2007) und das schlechtere Ansprechen von homozygoten T-Allelträgern in der Behandlung mit Antidepressiva (Wilkie et al., 2007). Es gibt eine Untersuchung in der kein Einfluss des GNB3 Genotyps auf das kardiovaskuläre Ansprechen auf Dexmedetomidin festgestellt werden konnte (Kurnik et al., 2008).

Um eine direkte Verbindung zwischen den Ergebnissen der Arbeit und den vorgestellten Assoziationen zu etablieren, fehlen Untersuchungen, die die denkbaren Zwischenschritte zwischen zellulärer Ebene und Krankheitsentwicklung beleuchten. Als Hypothese wäre denkbar, dass bei gleichem Reiz bei T-Allelträgern eine stärkere Vasokonstriktion auftritt, die ihrerseits ein möglicher Schritt bei der Entwicklung einer Hypertonie sein könnte, ähnlich der bereits beobachteten, vermehrten Vasokonstriktion der Koronargefäße.

Das GNB3 825T-Allel scheint auch Auswirkungen auf Immunfunktionen zu haben. Eine erhöhte Antigen-induzierte Zellproliferation wurde bei Individuen, die das 825T-Allel tragen, beobachtet. Auch die proliferative Reaktion auf IL-2 war signifikant höher bei 825T-Allel-Trägern als bei C-Allel-Trägern. An dieser T-Zell-Signaltransduktion sind vor allem G_i-Proteine beteiligt. Außerdem war die chemotaktische Antwort von T-Lymphozyten, v.a. der CD4⁺-T-Zellen, der 825T-Allel-Trägern deutlich erhöht.

Genetische Tests können ein wichtiges Hilfsmittel in der Präventionsmedizin werden, in der man das individuelle Risiko für erhöhten Blutdruck abschätzen möchte, um durch Änderung des Lebensstils dem „Schicksal“ eines Bluthochdruckes entgehen zu können. Gen-Untersuchungen könnten auch helfen, Nebenwirkungen und zum Beispiel den blutdrucksenkenden Effekt von manchen Medikamenten vorherzusagen. Diese Möglichkeiten können zu einer effizienteren Therapie und einer erhöhten Compliance seitens des Patienten führen (Siffert, 2000).

Die in dieser Dissertation geschilderten in vitro Daten zeigen die funktionellen Unterschiede der verschiedenen Gβ3-Varianten auf zellulärer Ebene im Sf9-Zellsystem. Die Aussagefähigkeit ist insofern einzuschränken, da Gβ3s und Gβ3L allein untersucht wurden. In vivo liegt ein Gemisch von verschiedenen Gβ und Gy-Untereinheiten vor. Daher ist nicht sicher, ob unter der Anwesenheit

unterschiedlicher konkurrierender $G\beta$ -Untereinheiten die gleiche physiologische Relevanz fortbesteht.

In weiteren Untersuchungen müssten die $G\alpha$ - und die $G\gamma$ -Untereinheiten der Sf9-Zellen durch humane $G\alpha$ - und $G\gamma$ -Untereinheiten ersetzt werden, um weitere Aussagen auf der zellulären Ebene machen zu können.

5. Zusammenfassung

Heterotrimere G-Proteine spielen in der Signaltransduktion eine wichtige Rolle. G β -Proteine gehören zu der Superfamilie der „Propellerproteine“, die 7 „Propellerblätter“ besitzen, welche aus 7 WD-Domänen gebildet werden. G β 3s ist eine Spleissvariante, die durch alternatives Spleissen 41 Aminosäuren, das heißt eine WD-Domäne und damit ein „Propellerblatt“ weniger enthält. Vorhergehende Untersuchungen zeigten eine Assoziation dieser alternativen Spleissvariante G β 3s mit dem T-Allel des GNB3 C825T Polymorphismus auf. In verschiedenen Assoziationsstudien konnten Zusammenhänge zwischen dem Vorhandensein des T-Allels und Erkrankungen, z.B. des Herzkreislaufsystems, festgestellt werden. Einen Einfluss auf die Effektivität verschiedener Medikamente wurde beobachtet. Ziel der vorliegenden Arbeit war eine funktionelle Untersuchung der Spleissvariante G β 3s auf zellulärer Ebene im Vergleich zur Wildtypvariante G β 3L. Hierzu wurden rekombinante Baculoviren, die G β 3L, G β 3s und M1-Acetylcholin-Rezeptor kodieren, hergestellt. Nach Klonierung der entsprechenden cDNA-Sequenzen in einen Shuttle-Vektor konnte eine Rekombination in die Baculovirus-DNA stattfinden. Mittels Sequenzierung wurden die genetische Information überprüft. Zunächst erfolgte die Virusamplifikation. Im folgenden Schritt wurden Sf9-Zellen infiziert und die Membranen präpariert, um mittels Westernblotuntersuchung die Proteine erwarteter Größe nachzuweisen. Die funktionellen Untersuchungen erfolgten mittels eines Fluoreszenzmikroskopes. Nach entsprechender Infektion der Sf9-Zellen mit den Baculoviren für einen der beiden G β 3-Untereinheiten und den M1-Acetylcholinrezeptor wurden die intrazellulären Ca⁺⁺-Signale der Sf9-Zellen gemessen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass es bei Expression der G β 3s-Untereinheit zu einer stärkeren Kalziumausschüttung kommt als bei der Expression des Wildtyps. Die biologische Aktivität der G β 3s-Untereinheit scheint höher zu sein als die der G β 3L-Untereinheit, was die bisherigen funktionellen Daten sowie klinischen Beobachtungen hinsichtlich der Funktion und Auswirkung des GNB3 825T-Allels unterstützt.

6. Literaturverzeichnis

1. Altmann, Friedrich, Staudacher, Erika, Wilson, Iain B.H., März, Leopold (1999):
Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins.
Glycoconjugate Journal 16, 109-123.
2. Anttila, Sami, Kampman, Olli, Illi, Ari, Rontu, Riikka, Lehtimäki, Terho, Leinonen, Esa (2007):
Association between 5-HT_{2A}, TPH I and GNB3 genotypes and response to typical neuroleptics: a serotonergic approach
BMC Psychiatry 7, 22
3. Baumgart, Dietrich, Naber, Christoph, Haude, Michael, Oldenburg, Olaf, Erbel, Raimund, Heusch, Gerd, Siffert, Winfried (1999):
G protein β 3 subunit 825T allele and enhanced coronary vasoconstriction on α_2 -adrenoceptor activation.
Circ. Res. 85, 965-969.
4. Bührmann, S., Nürnberger, J., Opazo Saez, A., Mitchell, A., Wenzel, R.R., Siffert, W., Philipp, T., Schäfers, R.F. (2004):
Healthy subjects carrying the G protein β 3 subunit 825T-allele exhibit higher uric acid serum levels.
Horm. Metab. Res. 36, 126-128.
5. Camilleri, Christopher E., Carlson, Paula J., Camilleri, Michael, Castillo, Emma J., Locke, G. Richard, Geno, Debra M., Stephens, Debra A., Zinsmeister, Alan R., Urrutia, Raul (2006):
A Study of Candidate Genotypes associated with dyspepsia in a U.S. Community.
Am J Gastroenterol 101, 581-592
6. Casiglia, Edoardo, Tikhonoff, Valérie, Caffi, Sandro, Martini, Bortolo, Guidotti, Federica, Bolzon, Monica, Bascelli, Anna, D'Este, Daniele, Mazza, Alberto, Pessina, Achille (2008):
Effects of the C825T polymorphism of the GNB3 gene on body adiposity and blood pressure in fertile and menopausal women: a population-based study
Genetic aspects 26(2), 238-243
7. Clapham, David E. (1995):
Calcium Signaling.
Cell 80, 259-268.

8. Clar, H., Langsenlehner, U., Krippel, P., Renner, W., Leithner, A., Gruber, G., Hofmann, G., Yazdani-Biuki, B., Langsenlehner, T., Windhager, R. (2007): A polymorphism in the G protein β_3 -subunit gene is associated with bone metastasis risk in breast cancer patients
Breast Cancer Res Treat 10.1007/s10549-007-9808-0
9. Dhein, Stefan, Van Koppen, Chris J., Brodde, Otto-Erich (2001): Muscarinic receptors in the mammalian heart.
Pharmacol. Res. 44, 161-182.
10. Dobrev, D., Wettwer, E., Himmel, H.M., Kortner, A., Kuhlisch, E., Schüler, S., Siffert, W., Ravens, U. (1999):
G-Protein β_3 -Subunit 825T allele is associated with enhanced human atrial inward rectifier potassium currents.
Circulation 102, 692-697.
11. Farfel, Zvi, Bourne, Henry R., Iiri, Taroh (1999):
The expanding spectrum of the G-protein diseases.
The New England Journal of Medicine, April 1, 1999, 1012-1020.
12. Fields, Timothy A., Casey, Patrick J. (1997):
Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins.
Biochem. J. 321, 561-571.
13. Frey, Ulrich H., Aral, Nese, Müller, Norbert, Siffert, Winfried (2003):
Cooperative effect of GNB3 825C>T and GPIIIa Pl(A) polymorphisms in enhanced platelet aggregation.
Thrombosis Res. 109, 279-286.
14. Gutersohn, Achim, Naber, Christoph, Müller, Norbert, Erbel, Raimund, Siffert, Winfried (2000):
G protein β_3 subunit 825 TT genotype and post-pregnancy weight retention.
The Lancet 355, 1240-1241.
15. Hamm, Heidi E. (1998):
The many faces of G protein signaling.
The Journal of biological chemistry 273, 669-672.
16. Hauner, H., Röhrig, K., Siffert, W. (2002):
Effects of the G-protein β_3 subunit 825T allele on adipogenesis and lipolysis in cultured human preadipocytes and adipocytes.
Horm. Metab. Res. 34, 475-480.
17. Hou, Yongmin, Chang, Vanessa, Capper, Austin B., Taussig, Ronald, Gautam, N. (2001) :
G Protein β Subunit Types Differentially Interact with a Muscarinic Receptor but Not Adenylyl Cyclase Type II or Phospholipase C- $\beta_2/3$.
The Journal of Biological Chemistry 276, No. 23, 19982-19988.

18. Hu, Yanfang, Rajan, Lekha, Schilling, William P. (1994):
Ca²⁺ signaling in Sf9 insect cells and the functional expression of a rat brain M₅ muscarinic receptor.
Am. J. Physiol. 266, C1736-C1743.
19. Jacobi, Johannes, Hilgers, Karl F., Schlaich, Markus P., Siffert, Winfried, Schmieder, Roland E. (1999):
825T allele of the G protein β_3 subunit gene (GNB3) is associated with impaired left ventricular diastolic filling in essential hypertension.
J. Hypertens. 17, 1457-1462.
20. Knight, Peter J.K., Pfeifer, Tom A., Grigliatti, Tom A. (2003):
A functional assay for G-protein-coupled receptors using stably transformed insect tissue culture cell lines.
Anal. Biochem. 320, 88-103
21. Kurnik, Daniel, Muszkat, Mordechai, Sofowora, Gbenga G., Friedman, Eitan A., Dupont, William D., Scheinin, Mika, Wood, Alastair J.J., Stein, C. Michael (2008):
Ethnic and genetic determinants of cardiovascular response to the selective α_2 -adrenoceptor agonist dexmedetomidine
Hypertension 51, 406-411
22. Leopoldt, Daniela, Harteneck, Christian, Nürnberg, Bernd (1997):
G proteins endogenously expressed in Sf9 cells: interactions with mammalian histamine receptors.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 356, 216-224.
23. Lindemann, Monika, Virchow, Sebastian, Ramann, Frank, Barsegian, Vahé, Kreuzfelder, Ernst, Siffert, Winfried, Müller, Norbert, Grosse-Wilde, Hans (2001):
The G protein β_3 subunit 825T allele is a genetic marker for enhanced T cell response.
FEBS Letters 495, 82-86
24. Marinissen, Maria Julia, Gutkind, J. Silvio (2001):
G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms.
Trends in Pharmacological Sciences 22, 368-376.
25. Mitchell, Anna, Rushentsova, Uljana, Siffert, Winfried, Philipp, Thomas, Wenzel, Rene R. (2006):
The angiotensin II receptor antagonist valsartan inhibits endothelin 1-induced vasoconstriction in the skin microcirculation in humans in vivo: Influence of the G-protein β_3 subunit (GNB3) C825T polymorphism.
Clin Pharmacol Ther 79(3), 274-81
26. Myung, Chang-Seon, Garrison, James C. (2000):
Role of C-terminal domains of the G protein β subunit in the activation of effectors.
PNAS 97, 9311-9316.

-
27. Naber, Christoph, Hermann, Burkhard Lorenz, Vietzka, Delia, Altmann, Christoph, Haude, Michael, Mann, Klaus, Rosskopf, Dieter, Siffert, Winfried (2000):
Enhanced epinephrine-induced platelet aggregation in individuals carrying the G protein β_3 subunit 825T allele.
FEBS Letters 484, 199-201.
28. Neer, Eva J. (1995):
Heterotrimeric G Proteins: Organizers of transmembrane signals.
Cell 80, 249-257.
29. Poch, Esteban, Gonzalez, Daniel, Gomez-Angelats, Elisenda, Enjuto, Montserrat, Paré, Joan Carles, Rivera, Francisca, De la Sierra, Alejandro (2000):
G-Protein β_3 subunit gene variant and left ventricular hypertrophy in essential hypertension.
Hypertens. 35 [part 2], 214-218.
30. Rosskopf, D., Frey, U., Eckhardt, S., Schmidt, S., Ritz, E., Hofmann, S., Jaksch, M., Müller, N., Hüsing, J., Siffert, W., Jöckel, K.-H. (2000):
Interaction of the G protein β_3 subunit T825 allele and the IRS-1 Arg972 variant in type 2 diabetes.
Eur. J. Med. Res. 5, 484-490.
31. Rosskopf, Dieter, Busch, Stefan, Manthey, Iris, Siffert Winfried (2000):
G Protein β_3 Gene: Structure, Promoter, and Additional Polymorphisms.
Hypertens. 36, 33-41.
32. Rosskopf, Dieter, Koch, Karin, Habich, Christiane, Geerdes, Jörg, Ludwig, Axel, Wilhelms, Sabine, Jakobs, Karl H., Siffert, Winfried (2003):
Interaction of the G β_3 s, a splice variant of the G protein G β_3 , with G γ - and G α -proteins.
Cellular Signaling 15, 479-488.
33. Rosskopf, Dieter, Manthey, Iris, Habich, Christiane, Kielbik, Marzena, Eisenhardt, Andreas, Nikula, Christiane, Urban, Melanie, Kohnen, Stefanie, Graf, Eva, Ravens, Ursula, Siffert, Winfried (2003):
Identification and characterization of G β_3 s2, a novel splice variant of the G-protein β_3 subunit.
Biochem. J. 371, 223-232.
34. Siffert, Winfried (2003):
Cardiovascular pharmacogenetics: On the way toward individually tailored drug therapy.
Kidney International 63, Supplement 84, S168-S171.

35. Siffert, Winfried (2000):
G-protein $\beta 3$ subunit 825T allele, hypertension, obesity, and diabetic nephropathy.
Nephrol. Dial. Transplant. 15, 1298-1306.
36. Siffert, Winfried, Forster, Peter, Jöckel, Karl-Heinz, Mvere, David A., Brinkmann, Bernd, Naber, Christoph, Crookes, Robert, Du P. Heyns, Anthon, Epplen, Jörg T., Fridley, Joy, Freedman, Barry I., Müller, Norbert, Stolke, Dietmar, Sharma, Arya M., Al Moutaery, Khalaf, Grosse-Wilde, Hans, Buerbaum, Bettina, Ehrlich, Tanja, Razi Ahmad, Hakimuddin, Horsthemke, Bernhard, Du Toit, Ernette, Tiilikainen, Anja, Ge, Junbo, Wang, Yulin, Yang, Dongliang, Hüsing, Johannes, Roszkopf, Dieter (1999):
Worldwide ethnic distribution of the G protein $\beta 3$ subunit 825T allele and its association with obesity in Caucasian, Chinese, and Black African individuals.
J. Am. Soc. Nephrol. 10, 1921-1930.
37. Siffert, Winfried, Naber, Christoph, Walla, Maria, Ritz, Eberhard (1999):
G protein $\beta 3$ subunit 825T allele and its potential association with obesity in hypertensive individuals.
Hypertens. 17, 1-4.
38. Siffert, Winfried, Roszkopf, Dieter, Siffert, Gerlinde, Busch, Stefan, Moritz, Albrecht, Erbel, Raimund, Sharma, Arya M., Ritz, Eberhard, Wichmann, H.-Erich, Jakobs, Karl H., Horsthemke, Bernhard (1998):
Association of a human G-protein $\beta 3$ subunit variant with hypertension.
Nature genetics 18 january 1998, 45-48.
39. Siffert, Winfried, Roszkopf, Dieter, Erbel, Raimund (2000):
Genetischer Polymorphismus in der G-Protein- $\beta 3$ -Untereinheit, Adipositas und essentielle Hypertonie.
Herz 25, 26-33.
40. Siffert, Winfried (2005):
G protein polymorphisms in hypertension, atherosclerosis and diabetes.
Annu. Rev. Med. 56, 17-28
41. Siffert, Winfried (2001):
Molecular genetics of G proteins and atherosclerosis risk.
Basic. Res. Cardiol. 96, 606-611.
42. Sperling, Herbert, Eisenhardt, Andreas, Virchow, Sebastian, Hauck, Ekkehard, Lenk, Severin, Porst, Hartmut, Stief, Christian, Wetterauer, Ulrich, Rübben, Herbert, Müller, Norbert, Siffert, Winfried (2003):
Sildenafil response is influenced by the G protein $\beta 3$ subunit GNB3 C825T Polymorphism: a pilot study
J. Urol. 169, 1048-1051.

-
43. Virchow, Sebastian, Ansorge, Nikolaus, Rübber, Herbert, Siffert, Gerlinde, Siffert, Winfried (1998):
Enhanced fMLP-stimulated chemotaxis in human neutrophils from individuals carrying the G protein β_3 subunit 825T allele.
FEBS Letters 436, 155-158.
44. Wenzel, René R., Siffert, Winfried, Bruck, H., Philipp, Thomas, Schäfers, Rafael F. (2002):
Enhanced vasoconstriction to endothelin-1, angiotension II and noradrenaline in carriers of the GNB3 825T allele in the skin microcirculation.
Pharmacogenetics 12, 489-495.
45. Wilkie, Murray J.V., Smith, Daniel, Reid, Ian C., Day, Richard K., Matthews, Keith, Wolf, Charles Roland, Blackwood, Douglas, Smith, Gillian (2007):
A splice site polymorphism in the G-protein β subunit influences antidepressant efficacy in depression.
Pharmacogenetics 17, 207-215
46. Zeltner, Raoul, Delles, Christian, Schneider, Markus, Siffert, Winfried, Schmieder, Roland E. (2000):
G-Protein β_3 Subunit Gene (GNB3) 825 T Allele is associated with enhanced renal perfusion in early hypertension.
Hypertens. 37, 882-886.
47. Zhang, L, Zhang H, Sun K, Song Y, Hui R, Huang X (2005):
The 825C/T polymorphism of G-protein beta3 subunit gene and risk of ischaemic stroke.
Journal of Human Hypertension 19, 709-714.
48. Zill, Peter, Baghai, Thomas C., Zwanzger, Peter, Schüle, Cornelius, Minov, Christo, Riedel, Michael, Neumeier, Karin, Rupprecht, Rainer, Bondy, Brigitta (2000):
Evidence for an association between a G-protein β_3 -gene variant with depression and response to antidepressant treatment.
Neuro. Report. 11, 1893-1897.

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Azetylcholin
AcMNPV	Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bam	Bacillus amyloliquefacies
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCh	Carbachol
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
(k)Da	(Kilo) Dalton
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-nukleosid-5'-triphosphat
DTT	DL-Dithiothreitol
Eco	Escherichia coli
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	fetales Kälberserum
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GNB3	G-Protein β 3
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde (hour)
H ⁺	Wasserstoffion
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IL2	Interleukin 2
InsP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
KI	Konfidenzintervall
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Na ⁺	Natriumion
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROI	Region of interest
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
Sf9	Spodoptera frugiperda 9
Taq Polymerase	DNA-Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethane
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
V	Volt
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranoside

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Benzrath, Stefanie
Geburt :	13.03.1979 in Düsseldorf
Wohnort:	Detmold
Familienstand:	ledig

Schulbildung:

1985 - 1989	Besuch einer Grundschule in Monheim am Rhein
1989 - 1998	Besuch eines Gymnasiums in Monheim am Rhein
03.06.1998	Allgemeine Hochschulreife

Studium:

10/1998- 05/2005	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät in Essen
28. Aug. 2000 28. Aug. 2001	Ärztliche Vorprüfung: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002-2003	Auslandsaufenthalt in Frankreich mit Absolvierung des 5. Studienjahrs
30. März 2004 04/2004-04/2005 25. April 2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Praktischen Jahr im Klinikum Niederberg, Velbert Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Aktuelle Tätigkeit:

seit 09/2005	Tätigkeit als Assistenzärztin in der Weiterbildung zum Facharzt für Kinder- und Jugendmedizin, Klinikum Lippe-Detmold, Kinder- und Jugendmedizinische Klinik
--------------	---